

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**BASES MOLECULARES DEL DÉFICIT ENZIMÁTICO
DEL COMPLEJO CITOCROMO *bc1* DEL SISTEMA
OXPHOS MITOCONDRIAL**

María del Carmen Gil Borlado

Licenciada en Ciencias Biológicas

Directora de tesis:

Dra. Cristina Ugalde Bilbao

Centro de Investigación

Hospital Universitario 12 de Octubre

Esta tesis doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una beca de formación en investigación por parte del Fondo de Investigaciones Sanitarias-Instituto de Salud Carlos III al proyecto de investigación PI 05/0379, asignada a María del Carmen Gil Borlado

A mis padres

A Juan

No conozco ningún camino seguro que conduzca al éxito;
sólo uno que conduce al fracaso seguro:
querer contentar a todos.

PLATÓN

“Rompo este huevo y nace la mujer
y nace el hombre. Y juntos vivirán
y morirán. Pero nacerán
nuevamente. Nacerán y volverán a
morir y otra vez nacerán. Y nunca dejarán
de nacer, porque la muerte
es mentira”.

EDUARDO GALEANO

Mito de los indios makiritare
Memorias del Fuego

Resulta casi grosero presentar una tesis, un trabajo de “uno” y de “muchos”, sin recordar a la gente que directa o indirectamente han colaborado con este trabajo.

Por ello, debo comenzar agradeciendo a los doctores Joaquín Arenas y Miguel Ángel Martín, el hecho de que me hayan permitido desarrollar esta tesis en su laboratorio y a la doctora Cristina Ugalde por supervisar mi trabajo, lo que me ha permitido enriquecerme científicamente, debido al alto nivel de exigencia impuesto. Por otro lado, este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de mis compañeros Alberto Blázquez, María Morán, Maritza González, Pilar del Hoyo, Juan Carlos Rubio, la pediatra Maite García Silva y, especialmente, Henry Rivera, nuestro niño grande, el “MacGiver” del laboratorio. No tan directamente vinculados con este trabajo, aunque no por ello menos importantes, son mis compañeros: Alberto García, quien ha demostrado tener un gran corazón y ser un gran compañero y amigo; Gaba, alias “la guacha”, que es de esas personas creativas y pizpiretas, que le alegran a uno el día. Una persona con gran avidez por las peroratas de sus compañer@s y amig@s, que siempre tiene un consejo o azote que dar por el bien de los demás, por eso he considerado llamarla “la madre del laboratorio”; Rosa, un ejemplo a seguir, puesto que es una trabajadora nata y una gran persona; Paco, a quien conocí en biomédicas y sigo teniendo cerca en el 12 de Octubre, que me ha hecho ver siempre el lado crítico de todos los ámbitos incluso de lo “incriticable”; Paz, una extraordinaria persona que invita a refugiarse en su calidez y a quien sólo le gustan algunos de mis perfumes; y al resto de mis compañeros, siempre correctos y muy amables, Crista, Moisés, Sara, Laura Rufián, Aitor, Lorena y, especialmente, Inés. También quería recordar a nuestras antiguas compañeras Yolanda Campos, Rebeca y Laura Mendaña.

Nuestro laboratorio tiene un sentido dentro del contexto del Centro de Investigación del Hospital 12 de Octubre. Quizás por ser un centro pequeño, he llegado a conocer a grandes profesionales y muy buenas personas. De un modo general, quería mandar un cálido saludo a los miembros del grupo de Porfirias; a los “Reumáticos”, especialmente a María por su atención desinteresada y a Begoña, al grupo de Alergia y Psiquiatría, especialmente, a Carlos, un buen compañero y una gran persona, a “Fofito” otro ejemplo a seguir por su gran calidad humana y por escucharme con mis problemas con la RT-PCR y a Marta, que aunque nos acompañó durante poquito tiempo, llegó a ser alguien entrañable; a las Solises, especialmente, a Teresa, con su risa carismática y particular; a nuestras compañeras de Oncología; a las veterinarias Montse y Mar, personas amables y encantadoras donde las haya, aunque Montse no se preocupe por mi muela porque tengo muchas, jaja; a Julia, una persona cálida y cercana; a Elena, nuestra “mexicana” simpaticona y que da unos masajes estupendos, por cierto, todavía está pendiente el mío; a nuestros antiguos compañeros Pedro, Guillermo y, sobre todo, Milu, una persona carismática. No hay palabras para describir a Milu, solo decir, que tiene mucho carácter, pero es muy buena persona, los que la conocen ya saben a lo que me refiero.

Para entender mi trayectoria científica y por qué he llegado hasta aquí, debo remontarme seis años atrás y agradecer la oportunidad que me brindó el profesor Rafael Garesse de introducirme en el mundo de la mitocondria y de mis primeros aprendizajes científicos, que no fueron pocos. Durante el periodo que estuve en su laboratorio, realicé la suficiencia investigadora y numerosas personas me ayudaron a hacer mi día a día más llevadero, empezando por los miembros que formaban entonces el grupo B19: Miguel, Belén, Paco, Pilar, Pablo, Cristina, Emiliano, Rosana, Álvaro, Carmina y Ana María Seguido. Especialmente, a Álvaro, por su compañerismo; a Rosana por su amabilidad y su calida sonrisa y; sobre todo, a Pilar, gran luchadora y defensora de los más débiles. Quería recordar a la gente de los laboratorios B-15, B-16, B-17, B-18 y B-20, especialmente, a Cristina Rodríguez, compañera y amiga de facultad, de inglés, de pizzas y casi de laboratorio, a Jesús, María y su pequeño Hugo, a Raúl y a Elenita, ahora también a su pequeña Claudia con mucho cariño. Además, estuve muy vinculada con la gente de biomédicas, especialmente, a Rubén, Josué, Ali, Oscar, Sergio, Irene, Lorena y Jesús, mi grupo de comida, cañitas y aventuras, algunos además de ajedrez. Quería agradecer también la simpatía y ayuda desinteresada, que me pudieron prestar compañeros y amigos de biomédicas, entre ellos, Guti, Jose Ramón y Javier Merino, de informática; los compañeros de imagen, principalmente, Javi; nuestras “cocineras”, principalmente, a Rosa; a Jacinto, a Amparo, a Carmen (secretaria), a Alejandra, a Gabriel, a Carlos y a los grandes ajedrecistas, Angelo y Alfonso Vich.

La vida no sólo consiste en trabajar, y durante estos años he tenido gente buena muy cerca de mí y que han sido un referente fundamental, una fuente inagotable de experiencias y aprendizaje. Entre ellos, están la familia de la facultad compuesta por mi gran amiga Marga, a la que considero “mi hermanita”. Ya sabes que te aprecio muchísimo, me has demostrado que estás ahí en los momentos buenos y en los malos, simplemente, decirte cuenta conmigo... Inma, ejemplo de mujer trabajadora, decidida y desenvuelta, sonriente y cautivadora, “maja” y buena amiga. Santi, mi otro “hermanito”, de memoria y cultura insuperables, buena persona, sabes que te aprecio de corazón. Miguel, el alma de la fiesta, un referente al aplomo, a la comprensión y a la ironía, con el que siempre se puede contar. David, a mi modo de ver un hombre polifacético y superdotado, un buen amigo. De todas tus facetas, me quedo con la artística y el gusto por la naturaleza. Willy, el sempiterno fiestero de inigualable sonrisa. Roberto, gran compañero de mi vida y al que podría decir que hemos crecido juntos, a ti te debo mucho. A esta gran familia hay que añadir a la gente que ha ido llegando después, como Luisma, a quien defino como el “heavy” profesor de filosofía de un colegio de curas y gran jugador de rol. Un tío estupendo. Gema, una gran compañera de viaje, gran cocinera y amiga, a la que se le da de maravilla la danza maorí e imitar a los “kiwis”. Chechu, el niño grande, una gran persona capaz de arrancarle una sonrisa a cualquiera. Para cerrar este grupo, recordar a Javi, María, Andrés y Modesto.

Un saludo especial a la familia de Roberto, especialmente, a Yolanda a quien aprecio mucho.

Quería agradecer el hecho de estar presente siempre en mi vida, a Nuria. Una amiga de siempre y para siempre. Un beso a tu familia.

Y por supuesto, quería agradecer y dedicar este trabajo a mi familia: mis padres, mis hermanos, mis cuñados, mi sobrinito Daniel, mi tío y mi abuelita querida Manuela, un gran ejemplo de bondad y buena persona. Ellos son mi pilar básico y gracias a ellos he llegado hasta aquí. Os quiero. Especialmente, a Juan, quien recientemente ha pasado a formar parte de mi vida y lo ha hecho pisando fuerte. Esta tesis es tan tuya como mía, puesto que la “has sufrido” de inicio a fin. Gracias por tu apoyo y tu comprensión, por tu paciencia y tu cariño. Un saludo especial a tu familia, padres, hermanos y tu niño, Iván “el terrible”. Con mucho cariño.

Resumen/Summary

La mitocondria es la fábrica energética de las células eucarióticas, almacenando energía en enlaces químicos de adenosina trifosfato (ATP) a partir de un proceso conocido como fosforilación oxidativa (OXPHOS). El sistema OXPHOS, situado en la membrana interna mitocondrial, está formado por cinco complejos enzimáticos multiproteicos que se organizan en estructuras supramoleculares llamadas supercomplejos o respirasomas, siendo el complejo citocromo *bc1* (complejo III) esencial para evitar la desestabilización y degradación de estas estructuras. Dicho complejo está formado por 11 subunidades codificadas por dos genomas diferentes, la subunidad citocromo *b* (CYTB) codificada por el ADN mitocondrial (ADNmt) y el resto de subunidades codificadas en el núcleo. Como resultado de múltiples investigaciones durante las últimas tres décadas, se ha realizado un progreso significativo en el campo de la estructura, función, ensamblaje y patología del complejo III.

Los déficits enzimáticos del sistema OXPHOS constituyen la primera causa de errores congénitos del metabolismo, siendo el déficit del complejo III un defecto relativamente común que está asociado con una amplia variedad de enfermedades multisistémicas, principalmente, neuromusculares. Las mutaciones que generan fallos en la biosíntesis de este complejo conducen a un déficit enzimático aislado o combinado de los complejos de la cadena respiratoria, produciéndose una disminución en la producción de energía. Las mutaciones que constituyen la causa más común de déficit del complejo III son las encontradas en el gen *citocromo b* (CYTB) del ADNmt. Las mutaciones en subunidades nucleares de este complejo son poco frecuentes, aunque estudios recientes asocian mutaciones en las subunidades 7 (QP-C) y 8 con un déficit del complejo III. Además de mutaciones en las subunidades estructurales, se han encontrado mutaciones en genes que codifican proteínas implicadas en su maduración y ensamblaje al complejo III, como es el caso del factor de ensamblaje BCS1L.

El objetivo de este trabajo fue estudiar las bases moleculares del déficit enzimático del complejo III humano, mediante las siguientes aproximaciones experimentales: i) identificar la causa genética responsable del déficit enzimático del complejo III en pacientes, ii) caracterizar las consecuencias fisiopatológicas celulares de las nuevas mutaciones encontradas y iii) estudiar los defectos en el ensamblaje o estabilidad del respirasoma mitocondrial, en muestras de pacientes con déficit del complejo III en los que no se conoce la causa genética para la enfermedad.

El desarrollo de estos objetivos ha permitido la identificación del polimorfismo raro m.15533A>G en el gen mitocondrial CYTB, así como la identificación de tres nuevas mutaciones: g.1181A>G, g.1164C>G y c.148A>G en el gen BCS1L, cuya patogenicidad ha sido caracterizada. Asimismo se ha estudiado el efecto que dichas mutaciones producen en la producción de especies reactivas del oxígeno, en los niveles de las defensas antioxidantes celulares, en la morfología de la red mitocondrial y en los niveles de apoptosis. Además, se han determinado distintos fenotipos de ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, en muestras de pacientes con un déficit enzimático primario del complejo III.

Mitochondria are called the power plants of the eukaryotic cell, storing the energy from nutrients into chemical bonds of adenosine triphosphate (ATP) in a process referred to as oxidative phosphorylation (OXPHOS). The OXPHOS system, which is located in a highly folded mitochondrial inner membrane, is composed of five multisubunit enzyme complexes, which in turn are organized in supramolecular structures named respirasomes or supercomplexes. Cytochrome *bc1* complex (complex III) seems to play an essential role for the stability and assembly of these macro-structures. Complex III comprises 11 subunits encoded by two separate genomes, i.e. only cytochrome *b* (CYTB) is encoded by mitochondrial DNA (mtDNA) and the rest of them by nuclear DNA (nDNA). As a result of extensive investigations during last three decades, significant progress has been made in the field of complex III structure, function, assembly and pathology.

Mitochondrial OXPHOS system deficiency constitutes the most common genetic defect of the energy metabolism. Complex III enzyme deficiency is a relatively common defect of the OXPHOS system, associated with a wide variety of multisystemic disorders. Mutations that generate a complex III biosynthesis impairment produce either an isolated or a combined complex III enzyme defect, leading to a decrease in energy production. mtDNA mutations in the *cytochrome b* (CYTB) gene constitute a major cause of complex III deficiency. Mutations in structural genes encoded by nDNA are not common, and only the genes *UQCRCQ* and *UQCRCB*, coding for complex III subunits, have been associated with complex III deficiency. Also, several mutations have been reported in proteins that are involved in the sorting and assembly of structural proteins into complex III, such as the assembly factor BCS1L.

The aim of this project was to characterize the molecular basis of human complex III deficiency on pathological conditions, caused by primary defects in the activity of this complex. The specific objectives of this work were: i) to identify the underlying genetic defect that causes complex III deficiency in a cohort of patients, ii) to elucidate the pathophysiological cellular consequences of the novel mutations identified, and iii) to assess the stability or assembly of mitochondrial complex III and other respiratory chain complexes in a subset of patients which genetic cause for the complex III enzyme defect remained unknown.

As a consequence of this thesis a new m.15533A>G rare polymorphism in the mitochondrial CYTB gene, and three novel pathogenic mutations in the BCS1L gene (g.1181A>G, g.1164C>G and c.148A>G) have been identified and their pathogenic mechanisms have been characterized. The effects of these mutations in ROS production, in the cellular antioxidant defences, in mitochondrial network morphology and apoptosis levels, have been determined. Moreover, distinct assembly patterns of mitochondrial respiratory chain complexes have been established in samples from patients with a primary complex III enzyme defect.

<i>Resumen/Summary</i>	15
<i>Índice</i>	19
<i>Abreviaturas</i>	27
<i>Introducción</i>	31
1. LA MITOCONDRIA	33
1.1. ORIGEN DE LA MITOCONDRIA	33
1.2. ESTRUCTURA DE LAS MITOCONDRIAS	33
1.3. GENOMA MITOCONDRIAL	34
1.4. FUNCIÓN Y ESTRUCTURA DEL SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA (OXPHOS).....	36
1.5. COMPLEJO III DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL.....	39
1.5.1. Estructura del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial.....	39
1.5.2. Función del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial.....	41
1.5.2.1. Función de las subunidades catalíticas (Ciclo Q)	41
1.5.2.2. Función de las subunidades accesorias	41
1.5.3. Biogenesis del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial	42
1.5.3.1. Factores de ensamblaje del complejo III	42
1.5.3.1.1. <i>Cbp3p</i> y <i>Cbp4p</i>	42
1.5.3.1.2. <i>CABC1</i>	43
1.5.3.1.3. <i>LETM1</i>	43
1.5.3.1.4. <i>BCS1L</i>	43
1.5.3.2. Ensamblaje del complejo III	44
2. ENFERMEDADES DEL SISTEMA OXPHOS: PATOLOGÍA MITOCONDRIAL. 45	
2.1. MUTACIONES EN EL ADNmt	46
2.2. GENÉTICA MITOCONDRIAL.....	46
2.2.1. Homoplasma y heteroplasma	46
2.2.2. Herencia del ADNmt.....	47
2.2.3. Transmisión del ADNmt y segregación mitótica	47
2.3. MUTACIONES EN EL ADN NUCLEAR.....	48
2.4. MECANISMOS PATOGENICOS Y CONSECUENCIAS FISIOPATOLÓGICAS CELULARES DE MUTACIONES QUE AFECTAN AL SISTEMA OXPHOS	49
2.5. SISTEMAS MODELO CELULARES Y ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LAS PATOLOGÍAS MITOCONDRIALES	50
3. DÉFICIT ENZIMÁTICO DEL COMPLEJO III MITOCONDRIAL	50
3.1. MUTACIONES EN EL GEN MITOCONDRIAL <i>CYTB</i>	51
3.2. MUTACIONES EN GENES ESTRUCTURALES NUCLEARES	51

3.3. MUTACIONES EN BCS1L	52
Hipótesis y Objetivos	53
Pacientes, materiales y métodos.....	57
1. PACIENTES.....	59
1.1. PACIENTE 1	59
1.2. PACIENTES 2 y 3	60
1.3. PACIENTE 4	61
1.4. PACIENTE 5	61
1.5. PACIENTE 6	62
1.6. PACIENTE 10	63
2. MATERIALES.....	63
2.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS	63
2.2. CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS	63
2.3. REACTIVOS, SOLUCIONES Y TAMPONES	64
2.4. OLIGONUCLEÓTIDOS	64
2.4.1. Análisis genético de <i>CYTB</i>	64
2.4.1.1. Oligonucleótidos usados en la secuenciación del gen <i>CYTB</i>	64
2.4.1.2. Oligonucleótidos usados para realizar el estudio de PCR-RFLP (ver abreviaturas) del polimorfismo m.15533A>G encontrado en el gen <i>CYTB</i>	65
2.4.2. Análisis genético de <i>BCS1L</i>	65
2.4.2.1. Oligonucleótidos usados para secuenciar los exones de la secuencia genómica de <i>BCS1L</i>	65
2.4.2.2. Oligonucleótidos usados para secuenciar los intrones de la secuencia genómica de <i>BCS1L</i>	66
2.4.2.3. Oligonucleótidos usados en la secuenciación de la región 5' no traducida (5' UTR) del ARNm de <i>BCS1L</i>	66
2.4.2.4. Oligonucleótidos usados en la secuenciación del ADN complementario (ADNc) de <i>BCS1L</i>	67
2.4.2.5. Oligonucleótidos usados para realizar el estudio de PCR-RFLP de las mutaciones g.1181A>G, g.1164C>G, c.148A>G y c.166C>T encontradas en el gen <i>BCS1L</i>	67
2.4.2.6. Oligonucleótidos usados en la cuantificación del ARNm de <i>BCS1L</i> mediante PCR a tiempo real (RT-PCR).....	67
2.5. ANTICUERPOS	68
3. MÉTODOS	69
3.1. OBTENCIÓN DE BIOPSIAS DE PIEL	69
3.2. GENERACIÓN DE CÍBRIDOS TRANSMITOCONDRIALES	69
3.3. CULTIVOS CELULARES	71

3.4. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL.....	71
3.5. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD CITRATO SINTASA	72
3.6. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL DE CÉLULAS DE PIEL (FIBROBLASTOS), DE SANGRE Y DE MÚSCULO	72
3.7. AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y CONDICIONES DE PCR GENERALES	73
3.8. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA	73
3.9. SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS	73
3.10. DETECCIÓN DE MUTACIONES POR PCR-RFLP.....	74
3.10.1. Detección del polimorfismo m.15533A>G en el gen <i>CYTB</i> detectada en el paciente 10.....	74
3.10.2. Detección de mutaciones en el gen <i>BCSIL</i> detectadas en el paciente 4.....	75
3.10.2.1. Detección de la mutación g.1181A>G en la secuencia genómica de <i>BCSIL</i>	75
3.10.2.2. Detección de la mutación g.1164C>G en la secuencia genómica de <i>BCSIL</i>	75
3.10.2.3. Detección de la mutación c.166C>T (p.R56X) en la secuencia genómica y en el ADNc de <i>BCSIL</i>	75
3.10.3. Detección de la mutación c.148A>G (p.T50A) del gen <i>BCSIL</i> detectada en el paciente 6	76
3.11. AISLAMIENTO DE ARN TOTAL DE FIBROBLASTOS	76
3.12. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DEL ARNm DEL GEN <i>BCSIL</i> MEDIANTE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-PCR).....	77
3.13. CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN 5' UTR DEL ARNm DE <i>BCSIL</i>	78
3.14. PREPARACIÓN DE LISADOS CELULARES Y SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.....	78
3.15. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ENSAYOS DE ELECTROFORESIS AZUL NATIVA (<i>BLUE NATIVE</i>)	78
3.15.1. Aislamiento de mitocondrias a partir de fibroblastos o cíbridos	78
3.15.2. Preparación de homogenados musculares	79
3.15.3. Aislamiento de mitocondrias a partir de homogenados musculares	79
3.16. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONALES EN CONDICIONES NATIVAS (<i>BLUE NATIVE</i>) Y ENSAYOS DE ACTIVIDAD EN GEL (IGAs).....	80
3.16.1. Electroforesis en primera dimensión (1D)	80
3.16.2. Electroforesis en segunda dimensión (2D).....	80
3.17. ENSAYOS DE ACTIVIDAD EN GEL (IGAs)	81
3.18. TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS UNIDAS A MEMBRANA (WESTERN BLOT).....	82
3.19. MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE H ₂ O ₂ EN CÉLULAS VIVAS	82
3.19.1. Citometría de flujo	82
3.19.2. Microscopía confocal	83
3.20. MORFOLOGÍA DE LA RED MITOCONDRIAL.....	83
3.21. ENSAYO DE MUERTE CELULAR	84

Resultados y discusión.....	85
------------------------------------	-----------

CAPÍTULO 1: Identificación de la causa genética responsable del déficit enzimático del complejo III.....87

1.1. SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>CYTB</i>	89
1.1.1. Caracterización de la variante genética encontrada en el gen <i>CYTB</i> en el paciente P10....	89
1.1.1.1. Análisis del ADNmt en el paciente P10.....	89
1.1.1.2. Análisis bioquímicos en muestras del paciente P10.....	91
1.1.1.3. Análisis de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial mediante electroforesis <i>blue native</i> en fibroblastos y cíbridos procedentes del paciente P10.....	92
1.2. SECUENCIACIÓN DEL GEN <i>BCS1L</i>	93
1.2.1. Caracterización de las mutaciones encontradas en el gen <i>BCS1L</i>	94
1.2.1.1. Análisis bioquímico y genético del paciente P4.....	94
1.2.1.1.1. Análisis de la secuencia genómica de <i>BCS1L</i> en el paciente P4.....	94
1.2.1.1.2. Análisis de la secuencia del ADNc de <i>BCS1L</i> en el paciente P4.....	96
1.2.1.1.3. Cuantificación de los niveles del ARNm de <i>BCS1L</i> en el paciente P4.....	98
1.2.1.2. Análisis bioquímico y genético del paciente P6.....	98
1.2.1.2.1. Análisis de la secuencia genómica de <i>BCS1L</i> en el paciente P6.....	100
1.2.1.2.2. Análisis de la expresión de <i>BCS1L</i> y de los complejos de la cadena respiratoria mediante electroforesis <i>blue native</i> en muestras biológicas del paciente P6.....	101
DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO 1.....	101
1. POLIMORFISMO m.15533A>G EN EL GEN MITOCONDRIAL <i>CYTB</i>	102
2. MUTACIONES EN EL GEN <i>BCS1L</i>	103
2.1. Patogenicidad de las mutaciones g.1181A>G y g.1164C>G en el gen <i>BCS1L</i>	104
2.2. Patogenicidad de la mutación c.148A>G en el gen <i>BCS1L</i>	106
2.3. Impacto de las mutaciones en el gen <i>BCS1L</i> sobre el fenotipo clínico.....	108

CAPÍTULO 2: Caracterización de las consecuencias fisiopatológicas celulares de las mutaciones en el gen *BCS1L*..... 109

2.1. ANÁLISIS GENÉTICO DE <i>BCS1L</i>	111
2.2. ANÁLISIS DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL.....	112
2.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE <i>BCS1L</i> Y DE LAS SUBUNIDADES DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MEDIANTE ELECTROFORESIS SDS-PAGE.....	114
2.4. ANÁLISIS DEL COMPLEJO <i>BCS1L</i> Y DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MEDIANTE ELECTROFORESIS <i>BLUE NATIVE</i>	114
2.5. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE H ₂ O ₂ Y DE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES.....	118
2.5.1. Niveles de H ₂ O ₂ en células vivas.....	118
2.5.2. Niveles de las defensas antioxidantes.....	120

2.6. ANÁLISIS DE LA DISPOSICIÓN DE LA RED MITOCONDRIAL Y DE LA LOCALIZACIÓN DE BCS1L.....	122
2.7. ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA.....	122
DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO 2	123
CAPÍTULO 3: Análisis del ensamblaje de los distintos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en pacientes con déficit enzimático del complejo III sin causa genética conocida	131
3.1. ESTUDIOS DE ENSAMBLAJE EN HOMOGENADO MUSCULAR.....	134
3.1.1. Estudio de ensamblaje realizado en homogenado muscular procedente de los pacientes con un déficit aislado del complejo III.....	134
3.1.2. Estudio de ensamblaje en homogenado muscular de pacientes con déficit combinado de los complejos III y I	138
3.2. ESTUDIOS DE ENSAMBLAJE EN FIBROBLASTOS	140
3.2.1. Estudio de ensamblaje realizado en fibroblastos procedentes de los pacientes P10, P18 y P25, con déficit combinado de los complejos III y IV en dicho tejido	140
3.2.2. Estudio de ensamblaje realizado en fibroblastos procedentes de pacientes con déficit enzimático aislado del complejo III, o combinado con un déficit de los complejos I ó IV	143
DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO 3	146
<i>Conclusiones.....</i>	<i>153</i>
<i>Bibliografía</i>	<i>157</i>
<i>Anexos</i>	<i>179</i>

Abreviaturas

2D-BN/SDS-PAGE	Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. 1D: azul nativa, 2D: condiciones desnaturalizantes
ADNg	ADN genómico
ADNc	ADN complementario
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
ALT	Alanina aminotransferasa
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN de transferencia
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosina trifosfato
BN-PAGE	Electroforesis azul nativa en geles de poliacrilamida (<i>blue-native</i>)
Células ρ_0	Células rho zero, que carecen de ADNmt
Cytb	Citocromo <i>b</i>
Cytc	Citocromo <i>c</i>
Cytc1	Citocromo <i>c</i> ₁
CO, COX	Citocromo <i>c</i> oxidasa
CoQ	Coenzima Q ₁₀ o ubiquinona
CPEO	Oftalmoplejía externa progresiva crónica
CS	Citrato sintasa
DCA	Dicloroacetato
DCFDA	Diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
Drp	Proteína de la familia de las dinaminas (<i>Dynamin-related protein</i>)
FBS	Suero fetal bovino
FRR	Fibras rojo rasgadas
GPx	Glutation peroxidasa
GRACILE	Acrónimo de los síntomas: retraso en el crecimiento, aminoaciduria, colestasis, sobrecarga de hierro, acidosis láctica y muerte temprana
HSP	Promotor de la cadena pesada del ADNmt
IGA	Ensayo de actividad en gel (<i>In gel activity</i>)
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LHON	Neuropatía óptica hereditaria de Leber
LS	Síndrome de Leigh
LSP	Promotor de la cadena ligera del ADNmt

Mfn	Mitofusina
MELAS	Miopatía, Encefalopatía, Acidosis Láctica y accidentes cerebrovasculares
MEM	Medio mínimo esencial
MERRF	Epilepsia mioclónica y fibras rojo rasgadas
MILS	Síndrome de Leigh heredado por vía materna
MNGIE	Síndrome de encefalopatía neurogastrointestinal mitocondrial
NARP	Neuropatía, Ataxia y Retinitis Pigmentosa
ND	NADH deshidrogenasa
NTB	Azul de <i>nitrotetrazolium</i>
O _H	Origen de replicación de la cadena pesada del ADNmt
O _L	Origen de replicación de la cadena ligera del ADNmt
OPA1	Gen 1 de la atrofia óptica (<i>Optic atrophy 1</i>)
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDK	Piruvato deshidrogenasa quinasa
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RISP	Proteína hierro-azufre de Rieske (<i>Rieske Iron-Sulfur Protein</i>)
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAM	Maquinaria de clasificación y ensamblaje mitocondrial
SDH	Succinato deshidrogenasa
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SOD	Superóxido dismutasa
TIM	Translocasa de la membrana mitocondrial interna (<i>Translocase of the inner membrane</i>)
TK	Timidina quinasa
Tm	Temperatura de <i>melting</i> o de anillamiento de los oligonucleótidos
TOM	Translocasa de la membrana mitocondrial externa (<i>Translocase of the outer membrane</i>)
TP	Timidina fosforilasa
UCP	Proteína desacoplante
UTR	Región no traducida (<i>Untranslated region</i>)

1. LA MITOCONDRIA

Las mitocondrias son orgánulos rodeados por membranas presentes en el citosol de cada célula eucariótica. La principal función de la mitocondria es producir energía utilizando oxígeno y los productos procedentes de la oxidación de los nutrientes (Mathews *et al.*, 2000).

1.1. ORIGEN DE LA MITOCONDRIA

El origen de la mitocondria data de hace unos 1.500 millones de años aproximadamente, cuando la atmósfera terrestre se enriqueció por primera vez de oxígeno. En este nuevo escenario, aquellos organismos capaces de evitar los efectos tóxicos del O₂, presentaban una clara ventaja evolutiva. Uno de esos organismos fue el resultado de la endosimbiosis entre una α -proteobacteria, con un metabolismo aerobio, y un organismo huésped anaerobio, posiblemente una célula proeucariota (Kurland y Andersson, 2000). En dicha relación, la proteobacteria actuaba retirando el oxígeno del citosol del huésped, que evitaba así sus efectos tóxicos, mientras que éste suministraba nutrientes como lípidos, glicerol o aminoácidos a la proteobacteria (Gabaldón y Huynen, 2003). La teoría endosimbiótica postulada en los años 70 por F. Taylor y L. Margulis, sitúa el origen de la mitocondria en este fenómeno de endosimbiosis (Margulis, 1975). Dicho evento ocurrió una sola vez a lo largo de la evolución, y por lo tanto se admite un origen único del conjunto de mitocondrias presentes en los distintos organismos eucariotas (Scheffler, 2001). Es en este pasado como organismo autónomo donde reside la explicación de algunas de las características más llamativas de la mitocondria, entre ellas el hecho de que posea su propio genoma.

1.2. ESTRUCTURA DE LAS MITOCONDRIAS

La mitocondria posee dos membranas especializadas, la membrana externa y la membrana interna. La membrana externa separa a la mitocondria del citosol, mientras que la membrana interna delimita en su interior la matriz mitocondrial. El compartimento que queda delimitado entre las membranas interna y externa se llama espacio intermembrana. Cada uno de estos compartimentos y membranas está compuesto por un grupo único de proteínas que los diferencia entre sí. La membrana externa mitocondrial es fácilmente permeable a pequeñas moléculas (≤ 5000 daltons) e iones desde el citosol al espacio intermembrana. La membrana interna mitocondrial es mucho más selectiva, conteniendo cardiolipinas y necesitando de la presencia de numerosos transportadores específicos responsables del transporte al interior de la mitocondria y procesamiento de las proteínas de destino mitocondrial sintetizadas en el citoplasma (Arco y Satrustegui, 2005). La membrana interna mitocondrial se encuentra muy

plegada, formando estructuras denominadas crestas que se proyectan hacia la matriz. Estas estructuras incrementan en gran medida la superficie de la membrana interna, que es el lugar físico donde se produce la fosforilación oxidativa y, por lo tanto, la síntesis de ATP mitocondrial, aumentando su capacidad funcional. Aunque el número de mitocondrias por célula es constante para cada tipo celular, oscilando entre 10^2 - 10^5 , la densidad de las crestas es variable, dependiendo principalmente de la demanda energética (Scheffler, 1999).

Tradicionalmente se ha considerado a la mitocondria como un orgánulo discreto, de forma esférica o alargada, y con unas dimensiones que normalmente están en torno a 3-4 μm de largo y 1 μm de diámetro. Sin embargo, la morfología mitocondrial dista en numerosos casos de esta visión de la mitocondria como organelas individuales, acercándose más a un sistema reticular donde las mitocondrias interaccionan entre sí mediante un proceso dinámico, dependiente de potencial de membrana, que implica eventos continuos de fusión y fisión mitocondrial (Legros *et al.*, 2002; Chan, 2006; Guillery *et al.*, 2008). El proceso de fusión mitocondrial no solo implica la fusión coordinada de las membranas externa e interna, sino también la mezcla de los contenidos de la matriz mitocondrial (Malka *et al.*, 2005). En estos procesos están implicadas proteínas como las mitofusinas Mfn1 y Mfn2 y las dinaminas OPA1 en el caso de la fusión, y Drp1 y Fis1 en el de la fisión (Rojo *et al.*, 2002; Chen y Chan, 2005). Así pues, la morfología mitocondrial es un parámetro altamente dinámico que puede ser regulado ajustando el balance entre los fenómenos de fusión y fisión mitocondrial, y coordinando dichos eventos con el crecimiento celular, la mitosis, la apoptosis y las enfermedades, en función de las necesidades de la célula (Cervený *et al.*, 2007; de Brito y Scorrano, 2008).

1.3. GENOMA MITOCONDRIAL

La mitocondria contiene su propio genoma, el ADN mitocondrial (ADNmt) (Nass y Nass, 1963). Cada célula somática de un organismo puede portar cientos e incluso miles de moléculas de ADNmt, conteniendo cada mitocondria de 2 a 10 moléculas de ADNmt.

El ADNmt humano es una pequeña molécula circular de doble cadena, de 16568 pares de bases (Anderson *et al.*, 1981; Andrews *et al.*, 1999). La composición de nucleótidos de las dos cadenas del ADNmt es diferente: una de ellas es rica en residuos de guanina y timina y se denomina cadena pesada (H), mientras que la otra se denomina cadena ligera (L). De los 37 genes que codifica el ADNmt, 28 están codificados en la cadena H y 9 en la cadena L. La mayoría de los genes codifican 2 ARN ribosómicos (ARNr 12S y 16S) y 22 ARN de transferencia (ARNt). Los 13 genes restantes codifican proteínas del sistema OXPHOS: 7 subunidades (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5 y ND6) de las 45 que forman el complejo I (NADH deshidrogenasa), una subunidad (citocromo *b*, CYTB) de las 11 del complejo III (complejo *bc1*), tres subunidades (COI, COII, COIII) de las 13 del complejo IV (citocromo *c*

oxidasa) y dos subunidades (ATP6 y ATP8) de las 16 proteínas que forman el complejo V (ATP sintasa) (figura 1). El resto de los aproximadamente 1500 genes que dan lugar al proteoma mitocondrial están codificados en el núcleo, son traducidos por ribosomas citoplásmicos y transportados a la mitocondria a través de diversos sistemas de importe de proteínas (Wallace, 2005). El genoma mitocondrial posee, por tanto, una capacidad codificante limitada y necesita coordinarse con el genoma nuclear para su correcta funcionalidad (Garesse y Vallejo, 2001).

El genoma mitocondrial es compacto: los genes estructurales no poseen zonas ni 5' ni 3' no traducidas (UTRs), no contienen intrones y los espacios intergénicos son mínimos, llegando en algunos casos a solapar entre ellos. Sólo existen dos regiones no codificantes en el ADNmt: una región de ~1 Kb que se denomina D-loop en mamíferos, donde se localizan el origen de replicación de la cadena pesada (O_H) y los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción mitocondrial (IT_L , IT_{H1} y IT_{H2}); y otra región de ~30 nucleótidos localizada en el interior de un *cluster* ARNt a dos-tercios desde el D-loop (Strachan y Read, 1999).

El ADNmt, se encuentra formando parte de complejos nucleoproteicos asociados a la membrana interna mitocondrial, denominados nucleoides (Bogenhagen *et al.*, 2003). Dichos nucleoides se consideran la unidad de transmisión y herencia del ADNmt. El genoma mitocondrial se replica y transcribe en el organelo. Los elementos *cis*- responsables de la regulación de estos procesos están localizados en la región D-loop del ADNmt. Sin embargo, todos los factores *trans*-activadores son codificados en el núcleo (Garesse y Vallejo, 2001).

El mecanismo de replicación del ADNmt está actualmente bajo debate. El primer modelo, sugerido hace 3 décadas (Kasamatsu y Vinograd, 1973) describe éste como una reacción asimétrica y asincrónica que envuelve dos orígenes de replicación independientes y unidireccionales, O_H y O_L (Clayton, 1982) (figura 1). Alternativamente, se ha propuesto un modelo (Holt *et al.*, 2000), en el que ambas cadenas se replicarían de manera simétrica y simultánea desde múltiples orígenes situados en una región amplia cercana al O_H (Bowmaker *et al.*, 2003). Aún permanece sin esclarecer si coexisten ambos mecanismos de replicación, quizás regulados por condiciones fisiológicas diferentes en la célula.

Los mecanismos de replicación y transcripción van ligados, puesto que se usa un mismo ARN cebador o *primer* como iniciador de la replicación del ADNmt y de la transcripción de la cadena L. Existen dos modelos para la transcripción de la cadena H: el primero (Montoya *et al.*, 1983) sugiere que la síntesis del ARN comienza en dos sitios, IT_{H1} y IT_{H2} (figura 1) localizados en el D-loop, mientras que el segundo modelo propone que existe un único sitio de inicio de la transcripción mayor, IT_{H1} (Clayton, 1992). La transcripción de ambas cadenas de ADNmt conduce a moléculas precursoras de ARN policistrónico. La que corresponde a la cadena L contiene 8 ARNt y el ARNm de *ND6*, mientras que la cadena H contiene el resto de genes mitocondriales (Attardi y Schatz, 1988).

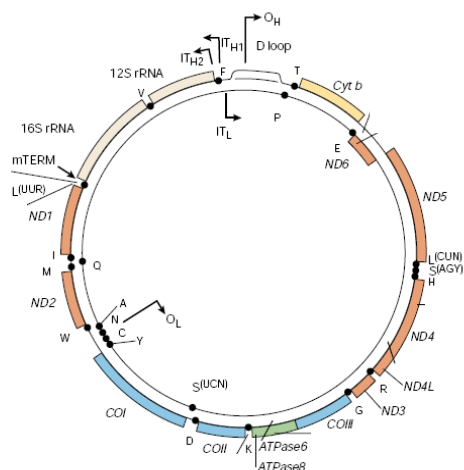


Figura 1. Representación del ADN mitocondrial humano. En el exterior se representa la cadena pesada y en el interior la cadena ligera. Los ARNt se representan por el código de una letra del aminoácido correspondiente. Se indican las posiciones de los orígenes de replicación de la cadena pesada (O_H) y ligera (O_L), así como los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción mitocondrial (IT_L , IT_{H1} y IT_{H2}) (Smeitink *et al.*, 2001).

Los genes de ARNr y casi todos los genes que codifican proteínas, están flanqueados por genes de ARNt. Esta organización genética ha conducido a la propuesta de que la estructura secundaria de “hoja de trébol” de los ARNt podría actuar como señal para las enzimas de procesamiento, ya que cortes endonucleolíticos precisos de los ARNt en los transcritos policistronicos darían lugar al correcto procesamiento de los ARNm y ARNr (Ojala *et al.*, 1981). En pocos casos donde no existen ARNt flanqueando los ARNm, existirían estructuras secundarias similares a las “hojas de trébol” de los ARNt, que serían reconocidas por las enzimas de procesamiento.

1.4. FUNCIÓN Y ESTRUCTURA DEL SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA (OXPHOS)

La mitocondria se encuentra presente en prácticamente todas las células eucariotas y en su interior tienen lugar un gran número de procesos metabólicos esenciales, que incluyen entre otros la oxidación de ácidos grasos, el ciclo de Krebs, y algunas etapas de la biosíntesis de aminoácidos y del grupo hemo. Sin embargo, se considera que la función fundamental de la mitocondria es la de generar energía química en forma de ATP mediante la combustión de los nutrientes obtenidos de la dieta, un proceso conocido como fosforilación oxidativa.

Por tanto, la fosforilación oxidativa (OXPHOS) constituye el proceso metabólico que proporciona la mayoría de la energía utilizable por las células. Este proceso acopla dos grupos de reacciones, la respiración y la síntesis de ATP, principal moneda energética celular. La respiración consiste en la transferencia secuencial de electrones extraídos del NADH y el $FADH_2$ a través de una cadena de reacciones de oxido-reducción, conduciendo a la reducción del oxígeno molecular a agua. Las reacciones de oxido-reducción son llevadas a cabo por cuatro complejos enzimáticos multiheteroméricos localizados en la membrana interna que constituyen

la cadena respiratoria mitocondrial; la NADH:ubiquinona oxidoreductasa (complejo I), la succinato:ubiquinona oxidoreductasa (complejo II), la ubiquinol:citocromo *c* oxidoreductasa (complejo III) y la citocromo *c* oxidasa (complejo IV). La energía liberada durante la respiración genera un gradiente de protones a lo largo de la membrana interna mitocondrial que es utilizado por la ATP sintasa (complejo V) para producir ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. Esta reacción es reversible y la ATP sintasa puede mantener el gradiente de H^+ a expensas de la hidrólisis de ATP (Scheffler, 1999) (figura 2).

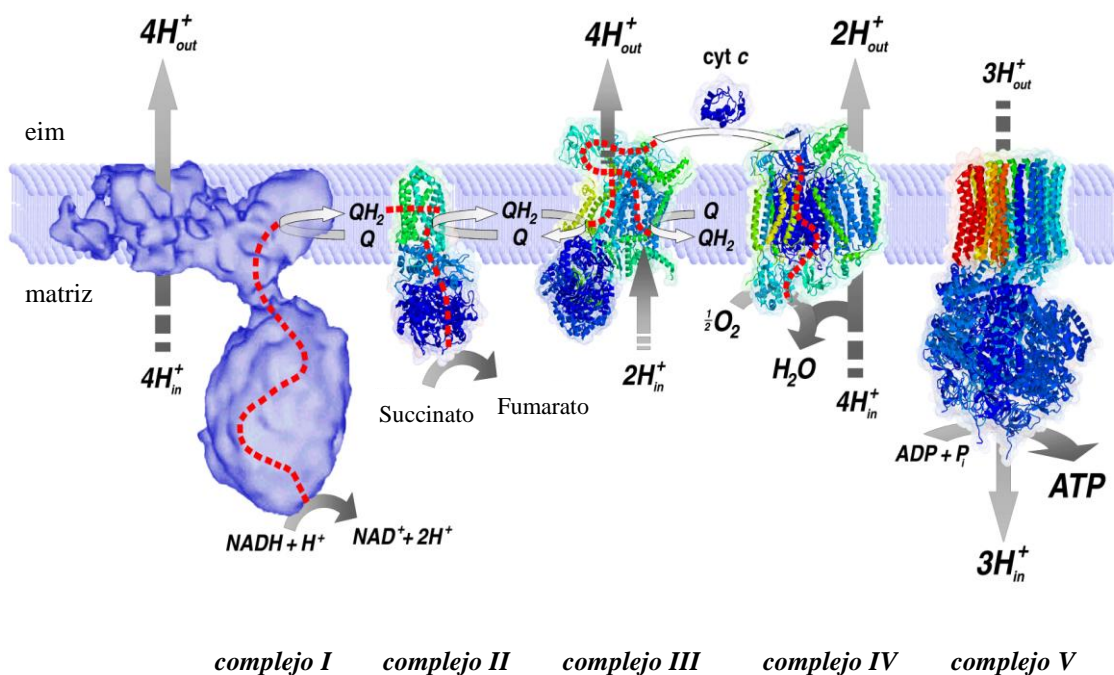


Figura 2. Esquema del sistema OXPHOS a través del cual los coenzimas reducidos provenientes del catabolismo de los nutrientes celulares, se oxidan y ceden sus electrones a la cadena de transporte electrónico y finalmente, al O_2 . El gradiente de protones generado se transforma en energía química, que es utilizada por el complejo V, ATP sintasa, para la producción de ATP. Cyt *c*: Citocromo *c*, Q: Ubiquinona oxidada, QH₂: ubiquinona reducida, eim: espacio intermembrana (Modificado de Nijtmans *et al.*, 2004).

Algunos procesos de transporte en la membrana mitocondrial son dependientes del gradiente electroquímico generado por el sistema OXPHOS, e incluyen el transporte no sólo de metabolitos sino también de iones inorgánicos como fosfato, sodio, potasio o calcio.

El sistema OXPHOS también juega un papel crucial en el mantenimiento de los balances (equilibrios) redox, ácido-base y metabólico de la célula, y por extensión en los compartimentos extracelulares (Smeitink *et al.*, 2006). Además, el potencial electroquímico generado por el sistema OXPHOS está implicado en el proceso de termogénesis que tiene lugar en el tejido adiposo marrón. Mediante la acción de la proteína desacoplante 1 (UCP1), la energía química generada por el gradiente de protones se disipa en forma de calor (Cannon y Nedergaard, 2004).

Existen otras proteínas desacoplates (UCP2 y UCP3) implicadas en la regulación de la producción de ROS como mecanismo de protección ante el estrés oxidativo, así como en la regulación de secreción de insulina por parte de las células β del páncreas (Brand y Esteves, 2005).

Se ha propuesto que los diferentes complejos del sistema OXPHOS no se encuentran de manera aislada en la membrana interna mitocondrial, sino que se unen entre ellos dando lugar a estructuras supramoleculares denominadas, supercomplejos o respirasomas (Schägger y Pfeiffer, 2000; Schägger, 2001; Eubel *et al.*, 2004a; Eubel *et al.*, 2004b; Krause *et al.*, 2004) (figura 3). Diversos estudios apoyan la coexistencia de supercomplejos y de complejos aislados en la membrana interna mitocondrial (Lenaz y Genova, 2007; Acín-Pérez *et al.*, 2008). El significado funcional de los supercomplejos podría ser maximizar la eficiencia de la respiración y la consiguiente producción de energía ante mayores requerimientos energéticos de la célula. Ello sería posible mediante la canalización de sustratos para evitar la competición con otras enzimas, evitando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estabilizando los complejos enzimáticos OXPHOS individuales (Schägger, 2002; Acín-Pérez *et al.*, 2004). Se ha cristalizado y estudiado el supercomplejo $\text{III}_2\text{+IV}$ en levaduras (Boekema y Braun, 2007; Heinemeyer *et al.*, 2007); el supercomplejo I+III_2 en *Arabidopsis thaliana* (Dudkina *et al.*, 2005) y los supercomplejos I+III_2 y $\text{I+III}_2\text{+IV}$ en bovino (Schafer *et al.*, 2006). Además mediante estudios bioquímicos, se ha determinado la presencia, tanto del complejo II, como de la ubiquinona y el citocromo *c* en supercomplejos (Acín-Pérez *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha estudiado la estequiometría de los supercomplejos en levaduras (Boekema y Braun, 2007) y en bovino (Schägger y Pfeiffer, 2000), siendo la especie mayoritaria en bovino el supercomplejo I+III_2 (Schägger y Pfeiffer, 2000).

Diversos estudios sugieren que un correcto ensamblaje del complejo III de la cadena respiratoria es esencial para la estabilidad y funcionamiento del complejo I dentro del respirasoma mitocondrial (Acín-Pérez *et al.*, 2004; Schägger *et al.*, 2004; Blakely *et al.*, 2005). Se ha observado que el complejo IV, de manera independiente al complejo III, mantiene la estabilidad del complejo I en mitocondrias de mamíferos (Díaz *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). Además, la falta de citocromo *c* da lugar a una desestabilización de los complejos I y IV (Fukui y Moraes, 2008). También se ha observado que la presencia de unos niveles mínimos del supercomplejo $\text{III}_2\text{+IV}$ es necesaria para dar lugar a respirasomas funcionales (D'Aurelio *et al.*, 2006). Inicialmente se pensaba que para la formación del supercomplejo $\text{III}_2\text{+IV}$ era necesaria la presencia de los complejos III y IV perfectamente ensamblados y dimerizados (Cruciat *et al.*, 2000). Sin embargo, en pacientes con déficit de la actividad enzimática del complejo III, se ha visto el acúmulo de especies intermediarias de ensamblaje del complejo III asociadas al complejo IV, formando el pre-complejo $\text{III}_2\text{+IV}$, lo que sugiere que el dímero incompleto del

complejo III es suficiente para la unión de otros complejos (Fernández-Vizarra *et al.*, 2007; Fernández-Vizarra *et al.*, 2009).

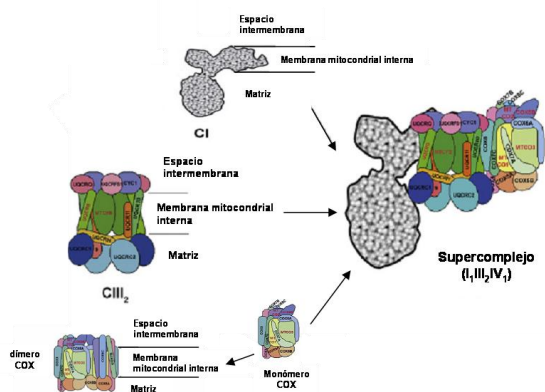


Figura 3. Esquema que muestra la formación del supercomplejo I₁III₂IV₁ en la membrana mitocondrial interna en humanos (modificado de (Fernández-Vizarra *et al.*, 2009)). CI: complejo I; CIII₂: complejo III; COX: complejo IV, IV.

1.5. COMPLEJO III DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

El complejo III mitocondrial (CIII, ubiquinol-citocromo *c* reductasa o complejo citocromo *bc*₁, E.C.1.10.2.2) es un complejo enzimático multiproteico que cataliza la transferencia de electrones desde el coenzima Q reducido al citocromo *c*, con una translocación concomitante de protones a través de la membrana mitocondrial interna (Baum *et al.*, 1967).

1.5.1. Estructura del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial

Hasta ahora, la mayoría de los estudios sobre los complejos de cadena respiratoria mitocondrial se han llevado a cabo en levadura. El complejo III de levadura contiene 10 subunidades (Ljungdahl *et al.*, 1987): 3 catalíticas (citocromo *b*, CYTB; citocromo *c*₁, CYC1 y la proteína hierro-azufre de Rieske, RISP) y 7 no catalíticas, importantes en la estabilidad del complejo (Berden *et al.*, 1988; Crivellone *et al.*, 1988) (tabla 1). Una de las subunidades está codificada en el genoma mitocondrial (CYTB) (Nobrega y Tzagoloff, 1980) y el resto son codificadas por el ADNn (Beckmann *et al.*, 1987; Berden *et al.*, 1988; Phillips *et al.*, 1990). El genoma nuclear también codifica proteínas que promueven la maduración del pre-ARNm de *CYB* (Pillar *et al.*, 1983; Gampel *et al.*, 1989), traducción del ARNm maduro (Rödel, 1986) y otras que ensamblan las distintas subunidades por mecanismos aún no muy conocidos (Wu y Tzagoloff, 1989).

El complejo III ha sido cristalizado en levadura, pollo y bovino como un homodímero simétrico con una masa molecular combinada de ~450 kDa (Xia *et al.*, 1997; Iwata *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Hunte *et al.*, 2000) (figura 4).

El complejo III de mamíferos está formado por 11 subunidades, una más que en levadura (tabla 1). Al igual que en levadura, posee tres subunidades catalíticas: CYTB, CYC1 y RISP, que contienen los grupos prostéticos, y las otras ocho son subunidades estructurales. Las 10

primeras subunidades están conservadas tanto evolutiva como funcionalmente. La subunidad adicional, subunidad 11, resulta del procesamiento de la presecuencia de la proteína RISP una vez que ésta última se ha integrado en la membrana interna mitocondrial.

Subunidad	Centros Redox	P _m	Función	Gen	aa	Cromosoma	Gen Levadura
Core I	no	52,6	No catalítica, proteína de transporte Podría mediar la formación del complejo entre los citocromos <i>c</i> y <i>c</i> ₁	UQCRC1	480	Cr. 3p21,3	<i>Qcr1</i>
Core II	no	48,4	No catalítica, proteína de transporte	UQCRC2	453	Cr. 16p12	<i>Qcr2</i>
CYTB	hemo <i>b_H</i> hemo <i>b_L</i>	42,7	Donador al sitio P Aceptor de semiquinona al sitio N Transferencia electrónica transmembrana	MTCYB MT-CYB CYTB	380	ADNmt	<i>CYB</i>
CYC1	hemo <i>c</i> ₁	35,4	Donador desde RISP a cyt <i>c</i>	CYC1	325	Cr. 8q24,3	<i>CYC1</i>
Rieske, FeS (RISP)	centros 2Fe.2S	29,7	Aceptor de QH ₂ Donador al cyt <i>c</i> ₁	UQCRFS1	274	Cr. 19q12-q13,1	<i>UCRI</i>
Subun. 6, Hinge	no	11	Proteína bisagra (interacciona con <i>c</i> ₁) Podría mediar la formación del complejo entre los citocromos <i>c</i> y <i>c</i> ₁	UQCRH	91	Cr. 1	<i>Qcr6</i>
Subun. 7	no	14	Redox asociado a bombeo de H ⁺	UQCRB	111	Cr. 8q22	<i>Qcr7</i>
Subun. 8, QP-C	no	9,5	Junto a cytb, une ubiquinona	UQCRQ	82	Cr. 5q31,1	<i>Qcr8</i>
Subun. 9	no	7,2	Interacciona con <i>c</i> ₁	UCRC10	63	Cr. 22q12	<i>Qcr9</i>
Subun. 10	no	6,4	Unión a la proteína RISP No presente en pollo	UQCR11	56	Cr. 19p13,3	<i>Qcr10</i>
Subun. 11	no	8,0	NC (procesada de RISP)	UQCRFS1	78	Cr. 19q12-q13,1	NO

Tabla 1. Composición del complejo III mitocondrial humano. P_m: peso molecular; aa: aminoácido; Cr.: cromosoma; subun.: subunidad; QH₂: ubiquinol; H⁺: protones; N: sitio electronegativo de la membrana interna mitocondrial; P: sitio electropositivo de la membrana interna mitocondrial; NC: no conocida y ADNmt: ADN mitocondrial.

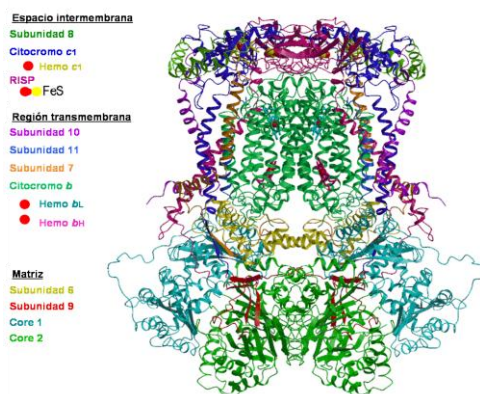


Figura 4. Homodímero simétrico del complejo III en bovino, con una masa molecular combinada de ~450 kDa (Iwata *et al.*, 1998). Cada monómero está compuesto de 11 subunidades, 10 codificadas en el núcleo y una (citocromo *b*) en el genoma mitocondrial.

1.5.2. Función del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial

1.5.2.1. **Función de las subunidades catalíticas (Ciclo Q)**

El complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial realiza dos funciones bien diferenciadas: reacción redox o transferencia electrónica y bombeo de protones, mediante un mecanismo denominado Ciclo Q (Mitchell, 1976). Estas reacciones redox y la química asociada a los protones tienen lugar en 2 centros separados topográficamente, el centro N en la matriz mitocondrial, y el centro P en el espacio intermembrana, los cuales están dispuestos hacia las caras electronegativa (N) y electropositiva (P) del complejo III.

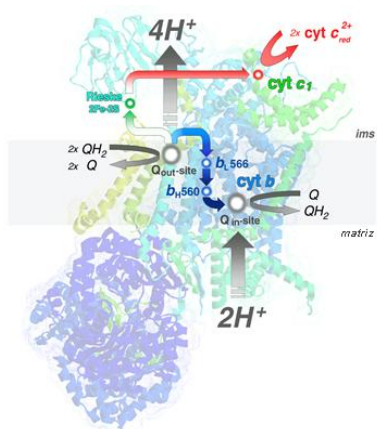


Figura 5. Ciclo Q. El balance del ciclo Q es de 2 moléculas de ubiquinol oxidadas, mientras que una ubiquinona es reducida a ubiquinol; 2 moléculas de citocromo *c* (cyt *c*) son reducidas, se captan 2 protones desde la matriz y se liberan 4 al espacio intermembrana (ims) (modificada de Nijtmans *et al.*, 2004). Q: ubiquinona; QH₂: ubiquinol; Qin site: centro P ó electropositivo de la membrana interna mitocondrial; Qout site: centro N ó electronegativo de la membrana interna mitocondrial.

En este ciclo se produce la oxidación divergente de dos moléculas de ubiquinol en el centro P. En la oxidación de la primera molécula de ubiquinol se transfieren dos electrones a los grupos hierro-azufre de la subunidad RISP y al hemo *b_L* del citocromo *b* (figura 5). Los grupos reducidos de la subunidad RISP oscilan permitiendo la transferencia electrónica desde los mismos al grupo hemo *c₁* de camino hacia el citocromo *c*. Se produce la liberación de dos protones desde el centro P coincidiendo con la oxidación del ubiquinol. El segundo electrón se transfiere desde el grupo hemo *b_L* al hemo *b_H* del citocromo *b*, el cual reduce la ubiquinona dando lugar a la formación de un intermediario estable, la ubisemiquinona. La oxidación del segundo ubiquinol en el centro P y la reducción del grupo *b_H* del citocromo *b* reduce la ubisemiquinona a ubiquinol, acompañado de la captación de dos protones en el centro N (Hunte *et al.*, 2003).

1.5.2.2. **Función de las subunidades accesorias**

Actualmente se desconocen las funciones que podrían estar desarrollando las subunidades accesorias, además de su papel estructural. Se ha estudiado en bovino que las subunidades Core 1 y Core 2 presentan actividad peptidasa y podrían estar implicadas en el procesamiento de otras

subunidades en la membrana interna mitocondrial (Yu *et al.*, 1999). En levaduras se ha descrito que la subunidad Qcr6p está implicada en la maduración del citocromo *c*₁ (Yang y Trumpower, 1994), que la subunidad Qcr7p está implicada en el bombeo de H⁺ (Lee *et al.*, 2001), que la subunidad Qcr8p une ubiquinona (Bruehl *et al.*, 1996), que la subunidad Qcr9p interacciona con el grupo *c*₁ (Graham *et al.*, 1992) y que la subunidad Qcr10p une la proteína hierro-azufre (Brandt *et al.*, 1994). En la tabla 1 se recoge un resumen de las funciones descritas hasta la fecha de las distintas subunidades del complejo III.

1.5.3. Biogenesis del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial

Para el correcto funcionamiento de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, no sólo son importantes las proteínas estructurales que dan lugar a dichos complejos, sino también aquellas proteínas requeridas para su ensamblaje, factores específicos para la maduración y traducción de los transcritos de las distintas subunidades, enzimas requeridas para la formación y reparto de los grupos prostéticos y activadores traduccionales específicos para la síntesis de citocromo *b* (Rödel, 1997). Estos factores de ensamblaje moleculares median en el correcto plegamiento de proteínas diana y su ensamblaje en estructuras oligoméricas sin ser componentes de las estructuras finales (Ellis y van der Vries, 1991).

1.5.3.1. Factores de ensamblaje del complejo III

Se han sido descritos 5 factores de ensamblaje del complejo III.

1.5.3.1.1. *Cbp3p* y *Cbp4p*

Cbp3p y *Cbp4p* son proteínas que actúan en los estadios tardíos del ensamblaje del complejo III en levaduras (Wu y Tzagoloff, 1989; Crivellone, 1994). Ambas proteínas están localizadas en la membrana mitocondrial y están presentes en complejos de alto peso molecular, los cuales representarían intermediarios de ensamblaje del complejo III (Kronekova y Rodel, 2005). *Cbp3p* favorece la incorporación de las subunidades RISP, CYC1 y Qcr7 en el complejo III (Shi *et al.*, 2001) y ayuda a la estabilización del supercomplejo III₂+IV. *Cbp4p* favorece la incorporación de las subunidades RISP, CYB, Qcr7 y Qcr8 en el complejo III e interacciona con *Cbp3p* para la formación/estabilización de subcomplejos del complejo III (Kronekova y Rodel, 2005). Los ortólogos de *Cbp3p* han sido identificados en varios organismos eucariotas aunque aún permanecen sin caracterizar.

1.5.3.1.2. *CABC1*

Se trata de una proteína humana, ortóloga de *abc1p* de levaduras, esencial para actividad del complejo III (Cardazzo *et al.*, 1998). Posiblemente, su función es mediar la incorporación de la subunidad CYTB en el complejo III (Bousquet *et al.*, 1991). *Abc1p* (conocida también como CoQ8), interviene en la ruta de biosíntesis de CoQ10 (Do *et al.*, 2001). Hay estudios que demuestran que *CABC1* está implicada en asegurar la correcta conformación y funcionamiento del complejo III y de los complejos II y IV en la cadena respiratoria mitocondrial (Brasseur *et al.*, 1997). Además, tiene un papel importante en la ruta de apoptosis mitocondrial inducible por p53 (Iiizumi *et al.*, 2002).

1.5.3.1.3. *LETM1*

La proteína transmembrana *LETM1*, ortóloga de *Mdm38p* de levaduras, está localizada en la membrana interna mitocondrial (Schlickum *et al.*, 2004) y se expresa, principalmente, en testículos y en espermatozoides (Tamai *et al.*, 2008). *Mdm38p*, está implicada en el mantenimiento de la morfología mitocondrial, regulando el intercambio K^+/H^+ mitocondrial (Nowikovsky *et al.*, 2004). La proteína *Mdm38p* se une a los ribosomas mitocondriales y podría tener un papel crítico en el transporte de proteínas desde la matriz mitocondrial (Frazier *et al.*, 2006). Estudios recientes en células HeLa han demostrado que la proteína *LETM1* está implicada en el ensamblaje de los complejos I, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial y en el mantenimiento del potencial de membrana (Tamai *et al.*, 2008). Además, *LETM1* interacciona con el factor de ensamblaje *BCS1L* (apartado 1.5.3.1.4), por lo que ambos factores podrían estar cooperando en la biogénesis de la cadena respiratoria mitocondrial (Tamai *et al.*, 2008).

1.5.3.1.4. *BCS1L*

El gen *BCS1L* humano consta de 9 exones, 7 de los cuales corresponden a la secuencia codificante, y 8 intrones. Se ha propuesto que existen diferentes especies de ARNm de *BCS1L* con la región 5' UTR procesada de forma alternativa (Petruzzella *et al.*, 1998; Visapää *et al.*, 2002). El tamaño del ARNm que corresponde a la variante del ADNc de *BCS1L* de Genbank: AF026849, es de 1429 nucleótidos.

BCS1L es una proteína de la membrana interna mitocondrial de 419 aminoácidos y con un 50% de identidad con la proteína *Bcs1p* de levaduras (Nobrega *et al.*, 1992; Petruzzella *et al.*, 1998). Esta proteína contiene tres dominios en su extremo amino terminal necesarios para su transporte a la mitocondria y su correcto procesamiento. Se tratan de: un dominio transmembrana (del aminoácido 45 al 69); una señal interna de transporte al interior de la mitocondria (del aminoácido

69 al 83) y que no es procesada. Esta zona está cargada con residuos positivos que ayudarían a la internalización en la mitocondria, de una manera dependiente de potencial de membrana y de ATP. Además, existe una región auxiliar (del aminoácido 83 al 126) que es necesaria para el importe y el correcto procesamiento de la proteína (Fölsch *et al.*, 1996; Stan *et al.*, 2003). También existe un dominio en el extremo carboxi terminal, de 200 aminoácidos hidrofóbicos y ácidos, característico de la familia AAA de las ATPasas que está muy conservado. Las proteínas de esta familia unen nucleótidos, muestran diferente localización subcelular y ejercen funciones dispares, como chaperonas, secreción proteica, fusión a membranas y regulación de la transcripción (Petrizzella *et al.*, 1998).

La única función bien caracterizada de BCS1L es su papel como factor de ensamblaje del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial, estudiado en detalle en levadura (apartado 1.5.3.2). En humanos, BCS1L tiene una función relacionada, pues pacientes con mutaciones en *BCS1L* que presentan déficit del complejo III, muestran alteraciones en el ensamblaje de dicho complejo (de Lonlay *et al.*, 2001; De Meirleir *et al.*, 2003; Fernández-Vizarra *et al.*, 2007; Blázquez *et al.*, 2009; Gil-Borlado *et al.*, 2009). Sin embargo, otro tipo de pacientes con mutaciones en *BCS1L* que dan lugar al síndrome de GRACILE (Fellman, 2002; Visapää *et al.*, 2002) no tienen disminución del complejo III y presentan sobrecarga de hierro, sugiriendo que BCS1L podría tener alguna función asociada al metabolismo del hierro (Visapää *et al.*, 2002). En este sentido, se especula que Bcs1p de levadura podría estar implicado en la incorporación del grupo hemo a las subunidades RISP y CYTB del complejo III (Nobrega *et al.*, 1992). Recientemente, se ha demostrado en ratón que BCS1L se expresa en estadios tempranos del desarrollo en el tubo neural con un patrón diferente al de las subunidades del complejo III, lo que sugiere su posible participación en el desarrollo de estructuras neurales (Kotarsky *et al.*, 2007).

1.5.3.2. Ensamblaje del complejo III

Basado en estudios previos en levaduras (Berden *et al.*, 1988; Grivell, 1989; Tzagoloff, 1995), existe un modelo hipotético de ensamblaje para las diez subunidades que forman el complejo III. Este proceso comenzaría con la formación independiente de tres subcomplejos diferentes, que se ensamblarían entre sí de una manera secuencial para formar el pre-complejo III o pre-complejo *bc1* (figura 6). El factor de ensamblaje Bcs1p se uniría al pre-complejo III y lo mantendría en un estado competente para la incorporación de las subunidades RISP y Qcr10p, de manera dependiente de ATP, para formar el complejo III totalmente ensamblado (Nobrega *et al.*, 1992; Fölsch *et al.*, 1996; Cruciat *et al.*, 1999). Cuando disminuyen los niveles del factor de ensamblaje Bcs1p, la incorporación de las subunidades RISP y Qcr10p al complejo III no tiene lugar y el ensamblaje se detiene, permaneciendo en forma de pre-complejo III (figura 6). Un

modelo propuesto recientemente por Zara y cols. (Zara *et al.*, 2007) propone la existencia de al menos cuatro subcomplejos distintos: uno de ellos formado por las subunidades CYTB, Qcr7p y Qcr8p; otro que contiene las subunidades RISP y Qcr9p; un tercero constituido por CYC1 y Core 1 y un último en el que se encuentran CYC1 y Core 2. Sin embargo, aún no se conoce en qué orden interaccionan las subunidades para formar los subcomplejos, ni la secuencia de interacción de estos subcomplejos para dar lugar a la enzima multimérica funcional.

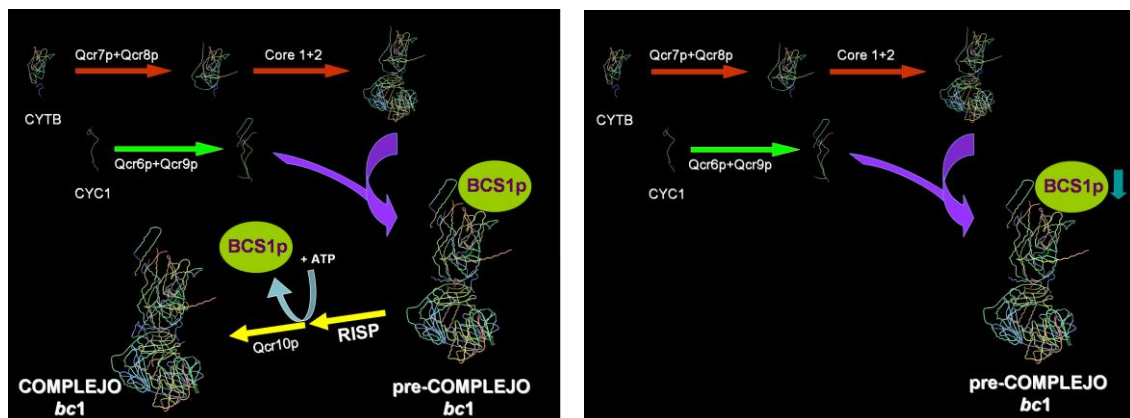


Figura 6. Modelo hipotético de ensamblaje del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial en levaduras. **Panel izquierdo,** Ocurre con la formación de tres subcomplejos diferentes; uno formado por las subunidades Citocromo *b*, Qcr7p y Qcr8p; otro formado por las subunidades Citocromo *c*1, Qcr6p y Qcr9p y otro, formado por las subunidades Core 1 y Core 2. Estos subcomplejos se ensamblan entre sí para formar el pre-complejo III o pre-complejo *bc*1. El factor de ensamblaje Bcs1p se une al pre-complejo III y lo mantiene en un estado competente para la incorporación de las subunidades RISP y Qcr10p, de manera dependiente de ATP. **Panel derecho,** Cuando los niveles del factor de ensamblaje Bcs1p están disminuidos, el ensamblaje se detiene en forma de pre-complejo III.

2. ENFERMEDADES DEL SISTEMA OXPHOS: PATOLOGÍA MITOCONDRIAL

El término de enfermedad mitocondrial se refiere a aquellas enfermedades donde el defecto afecta al sistema de fosforilación oxidativa. Dado el amplio número de procesos celulares en los que participa la mitocondria, no es extraño que los defectos en la fisiología mitocondrial estén asociados a un cada vez más amplio número de enfermedades y síndromes que abarcan prácticamente todas las especialidades médicas. Por ello y por la dificultad de asignar un origen definido a muchos de los fenotipos, la epidemiología de las enfermedades mitocondriales es complicada, aunque actualmente se considera que 1:5000 individuos nacidos vivos, está afectado por una enfermedad mitocondrial (Horvath *et al.*, 2008).

Las dos primeras mutaciones en el ADNmt se describieron en 1988. Se trataban de una delección en el ADNmt de pacientes con miopatía mitocondrial (Holt *et al.*, 1988), así como una mutación en el gen *ND4* en una familia con neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON) (Wallace *et al.*, 1988). Los estudios en una familia donde la oftalmoplejía externa progresiva era heredada

de manera autosómica dominante, asociada a la presencia de deleciones múltiples en el ADNmt (Zeviani *et al.*, 1989), constituyen la primera evidencia de un nuevo grupo de enfermedades mitocondriales de origen nuclear. Esto hizo volver la mirada al núcleo en años posteriores describiéndose la primera mutación en el ADN nuclear asociada a una enfermedad mitocondrial en 1995, en la subunidad *sdhA* del complejo II en dos hermanas con síndrome de Leigh (Bourgeron *et al.*, 1995).

A pesar de que cada año se describen nuevas mutaciones en ambos genomas y se identifican nuevos genes implicados en enfermedades mitocondriales, aún se desconocen los mecanismos patogénicos de la mayoría de dichas mutaciones (DiMauro, 2004). Por otro lado, cada vez se dedica más atención al papel que pueda jugar la mitocondria en el desarrollo de enfermedades metabólicas y degenerativas asociadas a la edad (Wallace, 2005). Desgraciadamente, aún no existen tratamientos adecuados para la mayoría de estas enfermedades (DiMauro *et al.*, 2006).

2.1. MUTACIONES EN EL ADNmt

Los tipos de mutaciones más frecuentes en el ADNmt son las grandes deleciones y las mutaciones puntuales. Hasta la fecha han sido descritas más de 200 mutaciones puntuales que afectan a los genes codificados en el ADNmt (DiMauro y Schon, 2008). Estas mutaciones afectan a los ARNt, a los ARNr y a los genes que codifican subunidades estructurales de los complejos OXPHOS (DiMauro, 2004).

La presentación clínica es muy variable e incluye fenotipos como el MELAS (Miopatía con Encefalopatía, Acidosis Láctica y accidentes cerebrovasculares), MERRF (Epilepsia Mioclónica y Fibras Rojo Rasgadas), NARP (Neuropatía, Ataxia y Retinitis Pigmentosa), MILS (Síndrome de Leigh heredado por vía materna) y LHON (neuropatía óptica hereditaria de Leber). Además, los síndromes causados por mutaciones en el ADNmt pueden muchas veces acompañarse por *diabetes mellitus*, cardiomiopatías, sordera neurosensorial y mioglobinuria.

2.2. GENÉTICA MITOCONDRIAL

Para entender la patogénesis de las enfermedades mitocondriales debidas a mutaciones en el ADNmt es necesario en primer lugar discutir aquellos aspectos que diferencian la genética mitocondrial de la mendeliana.

2.2.1. Homoplasmia y heteroplasmia

Es la consecuencia de la naturaleza poliploide -de cientos a miles de copias por célula- del ADNmt. De una manera simplificada se podría decir que define homoplasmia cuando todas las

copias del ADNmt son idénticas para un individuo particular, y heteroplasmia cuando coexisten dos o más genotipos distintos. Algunas mutaciones pueden afectar a todas las copias del genoma mitocondrial (mutación homoplásmica), mientras que otras solo estarán presentes en una fracción del total de copias del mismo (mutación heteroplásmica). Esto conduce a otra de las características de la genética mitocondrial, la presencia de un nivel mínimo para cada mutación necesario para que ocurra la expresión fenotípica o bioquímica del defecto mitocondrial. Es lo que se conoce como efecto umbral (Taylor y Turnbull, 2005).

Una gran parte de las mutaciones patogénicas son heteroplásmicas, y se ha podido establecer cierta correlación del grado de heteroplasmia con la severidad del fenotipo o al menos con el fenotipo bioquímico en un tejido determinado (Rigoli *et al.*, 2008). Esto ha hecho que tradicionalmente la heteroplasmia fuera incluida como uno de los criterios canónicos para la clasificación de una mutación como patogénica, a pesar de que existen numerosas mutaciones homoplásmicas asociadas a patología (Montoya *et al.*, 2008).

2.2.2. Herencia del ADNmt

El dogma principal de la genética mitocondrial lo constituye el hecho de que el ADNmt se herede exclusivamente del linaje materno, pues aunque algunas mitocondrias procedentes del espermatozoides puedan entrar al oocito durante la fertilización, éstas son eliminadas mediante un mecanismo dependiente de ubiquitina (Sutovsky *et al.*, 2000). Anecdóticamente, se publicó un trabajo donde se mostraban evidencias de herencia paterna en un paciente con miopatía mitocondrial esporádica con una microdelección en el gen *ND2* (Schwartz y Vissing, 2002). Sin embargo, estudios posteriores no han encontrado evidencias de herencia paterna en pacientes con miopatías mitocondriales esporádicas (Filosto *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2003).

2.2.3. Transmisión del ADNmt y segregación mitótica

Una mutación homoplásmica se suele transmitir a toda la descendencia materna. Sin embargo, existen factores adicionales que hacen que la expresión del defecto mitocondrial pueda ser diferente en los portadores de dicha mutación. Por ejemplo, muchos pacientes con LHON tienen mutaciones homoplásmicas en el ADNmt. Aunque toda la descendencia herede la mutación sólo en aproximadamente el 50% de los hombres y el 10% de las mujeres se desarrolla la enfermedad, indicando que deben existir factores genéticos de origen nuclear ó epigenéticos modulando la expresión fenotípica de estas mutaciones (Man *et al.*, 2003).

En el caso de las mutaciones heteroplásmicas, además de los factores nucleares y medioambientales se ha observado que en mamíferos las diferentes variantes de ADNmt segregan rápidamente entre generaciones a pesar del alto número de copias de ADNmt en el

oocito. Esto ha conducido al concepto genético de “cuello de botella” para la transmisión del ADNmt, que provoca que la cantidad de ADN mutado que hereda la descendencia sea variable (Hauswirth y Laipis, 1982; Olivo *et al.*, 1983; Laipis *et al.*, 1988). Hasta la fecha, los mecanismos propuestos para este fenómeno son controvertidos. Varios estudios han sugerido que el “cuello de botella” ocurre durante el desarrollo embrionario como resultado de una marcada reducción en el número de copias del ADNmt en la línea germinal (Jenuth *et al.*, 1996; Cree *et al.*, 2008). En cualquier caso, esta visión ha cambiado por estudios que sugieren que el “cuello de botella” ocurre sin una reducción en el contenido de ADNmt de la línea germinal (Cao *et al.*, 2007), concretamente se produciría durante la foliculogénesis postnatal y no durante la ovogénesis embrionaria (Wai *et al.*, 2008). Aunque el mecanismo de distribución de las mitocondrias (y el ADNmt) en las células hijas durante el proceso de división celular no se conoce, hoy en día se asume que las mitocondrias se segregan al azar. Como consecuencia, a partir de una condición inicial de heteroplasmia, las diferentes células van heredando diferentes proporciones de moléculas mutantes y normales. El resultado final consiste en un mosaicismo de los diferentes tejidos del organismo y, a priori, el porcentaje de ADNmt mutado presente en un determinado tejido es impredecible, pudiendo variar entre los diferentes hermanos de una familia que sufre una enfermedad con origen en el ADN mitocondrial. Este hecho dificulta extremadamente los posibles estudios de diagnóstico prenatal en estas familias.

2.3. MUTACIONES EN EL ADN NUCLEAR

Considerando que actualmente la causa genética se desconoce en más del 50% de los pacientes diagnosticados de enfermedad mitocondrial, parece claro que una parte importante de las enfermedades mitocondriales son probablemente debidas a mutaciones en alguno de los genes nucleares que codifican alguna de las proteínas que conforman el proteoma mitocondrial. Actualmente se conocen únicamente la mitad de estos genes, lo que implica una gran dificultad a la hora de diagnosticar correctamente las enfermedades mitocondriales de origen nuclear. Mediante aproximaciones *in silico*, se han identificado recientemente un gran número de genes nucleares candidatos a ser responsables de enfermedades de la cadena respiratoria (Gabaldón y Huynen, 2003; Calvo *et al.*, 2006; Pagliarini *et al.*, 2008).

Las mutaciones en genes nucleares que afectan a la cadena respiratoria pueden ser clasificadas en 4 grupos: i) mutaciones en genes que codifican subunidades de los complejos de la cadena respiratoria; ii) mutaciones en genes que codifican proteínas accesorias necesarias para el correcto ensamblaje y función de los complejos de la cadena respiratoria; iii) mutaciones que afectan a la estabilidad y replicación del ADNmt, las cuales pueden producir daños cuantitativos (depleción) o cualitativos (deleciones y duplicaciones) en el ADNmt y; iv) mutaciones que afectan de un modo indirecto a la cadena respiratoria mitocondrial. En este último apartado se

encontrarían las mutaciones en genes que codifican proteínas esenciales para diferentes procesos de la fisiología mitocondrial, como aquellas que afectan a la composición lipídica de la membrana, o las mutaciones en genes implicados en los procesos de fusión y fisión mitocondrial (Schon y DiMauro, 2007).

2.4. MECANISMOS PATOGENICOS Y CONSECUENCIAS FISIOPATOLÓGICAS CELULARES DE MUTACIONES QUE AFECTAN AL SISTEMA OXPHOS

La mitocondria también desempeña un papel central, en diversos procesos celulares, como la muerte celular programada (apoptosis) (Green, 2005), la señalización intracelular mediada por calcio (Bianchi *et al.*, 2004) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Turrens, 2003). Actualmente se desconoce el mecanismo patogénico de muchas enfermedades mitocondriales. Según la explicación convencional, las mutaciones responsables de producir un defecto en la biosíntesis de proteínas mitocondriales, provocan un defecto funcional del sistema OXPHOS. Por lo tanto, la causa fisiopatológica de estos síndromes sería un defecto en la producción de energía en forma de ATP. Como consecuencia se produciría una pérdida del potencial de membrana y un aumento en la generación de radicales libres, cambios en la dinámica mitocondrial, una pérdida de la homeostasis intracelular de calcio y una activación de la muerte celular, que en último lugar produciría una degeneración de los tejidos afectados.

Los defectos bioenergéticos modulan la morfología mitocondrial en fibroblastos humanos (Guillery *et al.*, 2008). Consistentemente con estos hallazgos, se ha observado en fibroblastos de pacientes que presentan un déficit enzimático del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial que existen alteraciones en el ensamblaje de dicho complejo, asociados a cambios en la morfología de la red mitocondrial (Koopman *et al.*, 2005; Verkaart *et al.*, 2007). Posteriormente, se observó que dichos cambios correlacionan con un aumento en la producción del anión superóxido (Koopman *et al.*, 2007; Verkaart *et al.*, 2007). Se plantea si antioxidantes externos pueden restaurar la morfología mitocondrial y la función de los fibroblastos en estos pacientes (Koopman *et al.*, 2007). Además, se ha observado que la mitocondria está distribuida por compartimentos, de manera que alteraciones o cambios en la morfología y red mitocondrial modificarían la distribución de enzimas y sustratos de compartimentos inactivos a activos, modulando la capacidad OXPHOS y atenuando los defectos energéticos (Benard y Rossignol, 2008). Se ha observado que la morfología mitocondrial *per se* no está envuelta en apoptosis, pero sí lo están las maquinarias de fusión y fisión mitocondrial, aunque se desconocen los mecanismos (Suen *et al.*, 2008) y que la cadena respiratoria modula la apoptosis, dependiendo de las señales del medio (Kwong *et al.*, 2007). Además, se ha correlacionado la producción de ROS con la severidad clínica de algunas patologías mitocondriales (Hinson *et al.*, 2007).

2.5. SISTEMAS MODELO CELULARES Y ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LAS PATOLOGÍAS MITOCONDRIALES

La limitada disposición de muestras humanas hacen necesario el uso de organismos modelo para el estudio de la patogénesis de estas enfermedades. Con este objetivo se han usado hasta la fecha diferentes organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* o *Mus musculus* (Larsson y Rustin, 2001). Entre ellos el ratón es el que ofrece más ventajas al ser el más cercano a los humanos tanto a nivel genético como fisiológico y morfológico. Sin embargo, la utilidad de estos modelos se ha restringido hasta el momento al estudio de mutaciones en el ADN nuclear, dada la enorme dificultad de obtener modelos de enfermedad mitocondrial causada por mutaciones en el ADNmt.

El sistema que ha demostrado ser más útil hasta el momento en el estudio de los mecanismos patogénicos asociados a mutaciones en el ADNmt, es el de los cíbridos transmitocondriales (Taylor y Turnbull, 2005). En este sistema, líneas celulares humanas cuyo ADNmt ha sido completamente eliminado (células ρ^0), son repobladas con mitocondrias procedentes de un paciente o donante. Las células ρ^0 no poseen una cadena respiratoria funcional y dependen del piruvato y uridina exógenos para crecer, lo que permite la fácil selección de los transformantes que contienen el ADNmt del paciente (King y Attardi, 1989). Este sistema ha permitido el estudio de las consecuencias bioquímicas y fisiológicas de mutaciones en el ADNmt (Pallotti *et al.*, 2004; Vives-Bauza *et al.*, 2006). También ha sido utilizado para estudiar el efecto del fondo genético nuclear sobre la segregación de mutaciones patogénicas (Dunbar *et al.*, 1995), el efecto del fondo genético mitocondrial sobre la biogénesis de los complejos OXPHOS (Pello *et al.*, 2008) o para demostrar la presencia de recombinación heteróloga en el ADNmt en células humanas (D'Aurelio *et al.*, 2004).

3. DÉFICIT ENZIMÁTICO DEL COMPLEJO III MITOCONDRIAL

Debido al origen bi-genómico del complejo, las mutaciones que conducen a un déficit enzimático del complejo III pueden ser debidas tanto a genes nucleares como a genes mitocondriales (Borisov, 2002). El déficit enzimático del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial [MIM 124000] es un déficit relativamente común del sistema OXPHOS, asociado con una amplia variedad de enfermedades multisistémicas, principalmente, neuromusculares (Borisov, 2002). Teniendo en cuenta los datos correspondientes a pacientes registrados como sospecha clínica o histomorfológica de enfermedad mitocondrial, en la base de datos del laboratorio de enfermedades mitocondriales del Centro de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, un 15-20% de pacientes presentan un déficit enzimático del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial, correspondiendo el 10% de estos

pacientes con un déficit aislado del complejo III, un 4,5% a un déficit combinado con el complejo I y un 4% a un déficit combinado con el complejo IV.

3.1. MUTACIONES EN EL GEN MITOCONDRIAL *CYTB*

Las mutaciones que constituyen la causa más común de déficit del complejo III son las mutaciones en el gen *citocromo b* (*CYTB*) del ADNmt (Andreu *et al.*, 1999b).

Evolutivamente, *CYTB* es una proteína hidrofóbica altamente conservada que contiene ocho o nueve dominios transmembrana y dos grupos hemo. Hasta la fecha, al menos 27 mutaciones diferentes han sido descritas en este gen, mayoritariamente en adultos que cursan intolerancia al ejercicio, debilidad proximal de miembros y acidosis láctica (Andreu *et al.*, 1999a; Andreu *et al.*, 1999b; Legros *et al.*, 2001), y en niños que cursan cardiomiopatía asociada a fibras rojo rasgadas (FRR) (Cormier *et al.*, 1991; Keightley *et al.*, 2000). Existen otras manifestaciones multisistémicas que incluyen síntomas que afectan al sistema nervioso central (Keightley *et al.*, 2000; Wibrand *et al.*, 2001). Las mutaciones en el gen *CYTB* [MIM 516020], pueden estar asociadas tanto a un déficit aislado del complejo III, como a un déficit combinado de los complejos I y III, posiblemente debido a la interdependencia estructural de estos complejos para formar supercomplejos activos enzimáticamente (Lamantea *et al.*, 2002; Acín-Pérez *et al.*, 2004; Schägger *et al.*, 2004; Blakely *et al.*, 2005). Además, se ha observado en levadura que mutaciones en los genes que codifican proteínas que están implicadas en la maduración del *CYTB* y en su ensamblaje al complejo III, provocan disminución de *CYTB* y otras subunidades del complejo III (Berden *et al.*, 1988; Crivellone *et al.*, 1988).

3.2. MUTACIONES EN GENES ESTRUCTURALES NUCLEARES

Aunque 10 de las 11 subunidades del complejo III están codificadas en el núcleo, las mutaciones en dichos genes son poco frecuentes. Esto podría ser un reflejo de la naturaleza altamente deletérea de dichas mutaciones, que darían lugar a letalidad durante la embriogénesis. Hasta la fecha, se ha descrito un caso aislado de un paciente que portaba una delección de 4 nucleótidos (c.338_341delAAAA) en homocigosis en el gen autosómico *UQCRB*, [MIM 191330] (Haut *et al.*, 2003), que codifica la subunidad 7 del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial. Dicho paciente presentaba un déficit aislado de la actividad enzimática del complejo III asociado a bajos niveles de *CYTB*, hipoglucemia, acidosis láctica y disfunción hepática. Más recientemente, se ha descrito una nueva mutación (c.208C>T, p.Ser45Phe) en homocigosis en el gen *UQCRQ* [MIM 612080] (Barel *et al.*, 2008), que codifica la subunidad 8 (también llamada QP-C) del complejo III, en 20 miembros de una familia

beduina israelí que presentaban un déficit aislado del complejo III asociado a un fenotipo neurológico severo de herencia autosómica recesiva.

3.3. MUTACIONES EN BCS1L

Se han descrito 25 mutaciones en el gen *BCS1L* [MIM 603647], involucrado en el ensamblaje del complejo III. Estas mutaciones provocan tres fenotipos clínicos: i) el **déficit enzimático del complejo III**, presente en neonatos que cursan con encefalopatía, de manera aislada o en combinación con afectaciones viscerales, principalmente en riñón e hígado, [MIM 124000] (de Lonlay *et al.*, 2001; De Meirleir *et al.*, 2003; Fernández-Vizarra *et al.*, 2007; Blázquez *et al.*, 2009; Gil-Borlado *et al.*, 2009); ii) el **Síndrome de GRACILE**, que es un acrónimo para los síntomas: retraso del crecimiento fetal, aminoaciduria, colestasis, sobrecarga de hierro, acidosis láctica y muerte temprana. Se trata de una enfermedad de herencia fina provocada por la mutación S78G en homocigosis, [MIM 603358] (Fellman, 2002; Visapää *et al.*, 2002) y iii) el **Síndrome de Björnstad**, enfermedad autosómica recesiva caracterizada, principalmente, por sordera neurosensorial y *pili torti* [MIM 262000] (Hinson *et al.*, 2007). Tres de las mutaciones que, en heterocigosis, dan lugar al síndrome de Björnstad, han sido asociadas a un déficit enzimático del complejo III (figura 23).

Los fenotipos más severos son los que dan lugar al síndrome de GRACILE y a un déficit de la actividad enzimática del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial. Ambos fenotipos tienen en común el retraso severo en el crecimiento, acidosis láctica, aminoaciduria y muerte a edad temprana, siendo el hígado el órgano más afectado. Lo que diferencia a estos fenotipos, es que el síndrome de GRACILE tiene sobrecarga de hierro y no tiene déficit del complejo III, ni características dismórficas ni síntomas neurológicos (Fellman *et al.*, 1998). Por otro lado el fenotipo menos agresivo es el síndrome de Björnstad, cuyos pacientes tienen una vida media normal y pueden presentar o no alteraciones metabólicas.

A pesar de que la función esencial de *BCS1L* en el ensamblaje del complejo III apunta a una proteína expresada ubicuamente, existen sin embargo diferencias de expresión dependiente de tejido, como señalamos en el apartado 1.5.2.2.4. Esto explicaría las manifestaciones específicas de órgano de la enfermedad. Las mutaciones en este gen parecen afectar a los últimos pasos del ensamblaje del complejo III. En pacientes con mutaciones en *BCS1L* se ha demostrado que el complejo III está parcialmente ensamblado, en forma de un pre-complejo III (Crivellone *et al.*, 1988; Schoppink *et al.*, 1988), que puede dimerizar y unirse a otros complejos, aunque no es funcional (Fernández-Vizarra *et al.*, 2007; Fernández-Vizarra *et al.*, 2009). Además, algunas mutaciones en *BCS1L* alteran el ensamblaje del respirasoma mitocondrial, reduciendo la actividad de la cadena de transporte electrónico y aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno (Hinson *et al.*, 2007).

Hipótesis y Objetivos

La mayor parte de las mutaciones relacionadas con el déficit enzimático del complejo citocromo *bc₁* (complejo III) se han adscrito al gen mitocondrial *CYTB*. Sin embargo, existe un número elevado de pacientes con déficit enzimático del complejo III mitocondrial en los que no existe evidencia de herencia materna. Estos pacientes podrían presentar mutaciones en algunos de los genes nucleares implicados en la biosíntesis de dicho complejo. Entre ellos cabe destacar los genes estructurales que codifican subunidades del complejo, o aquellos cuyos productos intervienen en el proceso de ensamblaje del complejo III. Es muy probable que el origen del déficit enzimático en alguno de estos pacientes sea debido a mutaciones en dichos genes.

Por otra parte, estudios recientes han demostrado que un correcto ensamblaje del complejo III de la cadena respiratoria es esencial para la formación, estabilidad y funcionamiento del respirasoma mitocondrial. Por tanto, mutaciones que generen fallos en el ensamblaje o estabilidad del complejo III probablemente conducirán a una reducción de la actividad y niveles estacionarios de otros complejos OXPHOS, especialmente de los complejos I y IV, lo que se traducirá en un déficit enzimático combinado de los complejos afectados y un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno.

El principal objetivo de este trabajo constituye el estudio las bases moleculares del déficit enzimático del complejo III humano, en patologías mitocondriales debidas a fallos primarios en la actividad de dicho complejo. Dentro de este interés, los objetivos concretos de esta tesis se dividen en tres partes bien diferenciadas:

- 1) Identificar la causa genética responsable del déficit enzimático del complejo III secuenciando, inicialmente, el gen mitocondrial *CYTB* y, posteriormente, ampliar la búsqueda de genes nucleares responsables de dicho déficit. Para ello se ha estudiado la presencia de mutaciones en el gen autosómico que codifica el factor de ensamblaje BCS1L, en un grupo de pacientes con déficit aislado del complejo III o con un déficit combinado de los complejos I+III ó III+IV.
- 2) Caracterizar los mecanismos patogénicos de las nuevas mutaciones encontradas, estudiando el proceso de ensamblaje o estabilidad del complejo III y de los otros complejos OXPHOS, la producción de especies reactivas del oxígeno, los niveles de las defensas antioxidantes, la morfología de la red mitocondrial y los niveles de apoptosis.
- 3) Estudiar los defectos en el ensamblaje o estabilidad del complejo III mitocondrial y de otros complejos OXPHOS, haciendo un estudio retrospectivo sobre homogenados musculares y/o fibroblastos de pacientes sin causa genética conocida, disponibles en nuestro laboratorio. Con ello se pretende mejorar el conocimiento sobre la biogénesis del respirasoma humano y el diagnóstico de las patologías mitocondriales.

Pacientes, materiales y métodos

1. PACIENTES

El criterio de selección de los pacientes estudiados en este trabajo, además de su expresión clínica, se fundamentó en la presencia de un déficit enzimático del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial en músculo, de forma aislada o en combinación con déficits en los complejos I o IV. Se secuenció el gen *CYTB* en ADN procedente de músculo y/o fibroblastos de 33 pacientes preseleccionados bajo estos criterios, encontrando el polimorfismo m.15533A>G, no descrito previamente, en el paciente P10, el cual fue caracterizado. Posteriormente, se secuenció el gen *BCS1L* en 20 de estos pacientes, en los cuales se habían descartado mutaciones en el gen *CYTB*, encontrando mutaciones en 3 de ellos. Las mutaciones de estos pacientes fueron caracterizadas para demostrar su patogenicidad. Se llevó a cabo un estudio comparativo en fibroblastos procedentes de 6 pacientes que portaban mutaciones en el gen *BCS1L*, 3 de ellos descritos en el laboratorio y los otros 3 cedidos por la Dra. Sara Séneca (Bélgica), para analizar los efectos fisiopatológicos de las mutaciones encontradas en dichos fibroblastos. Se llevaron a cabo estudios de ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria mediante electroforesis bidimensional nativa (*blue native*), con homogenados musculares procedentes de 13 pacientes con un déficit enzimático aislado del complejo III y de 5 pacientes con un déficit combinado de los complejos III y I. Además, se realizaron estudios de ensamblaje en fibroblastos de 7 pacientes.

Todos los pacientes y un resumen de los datos más relevantes de sus cuadros clínicos aparecen recogidos en las tablas 6, 7, 8 y 9 (ver en resultados). En la tabla 6 se describen los hallazgos más significativos de aquellos pacientes con mutaciones en el gen *BCS1L*. En las tablas 7, 8 y 9, se describen los de aquellos en los que se han encontrado defectos en el ensamblaje o estabilidad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, sin haberse detectado mutaciones en genes del complejo III. Se seleccionaron como sujetos control 200 familiares de pacientes para los que no existía evidencia clínica, histológica o bioquímica de sufrir una patología mitocondrial. El rango de edad abarca desde la infancia a la edad adulta, con una proporción equivalente de hombres y mujeres. Dichas muestras proceden del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid.

A continuación se detallan los hallazgos clínicos de aquellos pacientes en los cuales se ha encontrado la causa genética que genera el déficit enzimático del complejo III, conduciendo a una patología mitocondrial.

1.1. PACIENTE 1

Se trata de una niña de origen turco, que a los 11 días de edad fue remitida a un centro hospitalario con acidosis metabólica. Los padres son primos-hermanos. En los exámenes físicos,

el peso corporal fue de 2070 g (percentil 3), la altura de 50 cm (entre los percentiles 3-10), perímetro craneal de 33 cm (percentil 3). Presentaba hipotonía severa, con reflejos muy débiles y el hígado era palpable a 2 cm bajo el costado derecho. Los análisis de sangre mostraron niveles de pH: 7,25 (normal: 7,37), bicarbonato: 10 mM (17-24), ácido láctico: 62 mM (N: 4,5-9,8), ácido pirúvico: 1,8 mM (0,3-1), relación láctico/pirúvico: 34. En suero, los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) fueron 361 U/L (13-45), los de aspartato aminotransferasa (AST) 277 U/L (25-75), los de albumina: 2,2 g/dL (3,2-4,8), γ -glutamyl transferasa (GGT) 558 U/L (4-120). Los niveles de ferritina en suero fueron 2000 ng/mL (25-200), la capacidad de unión a hierro 76 μ g/dL (100-400) y los niveles de transferrina fueron 0,9 g/L (1,30-2,75). En orina se detectó un incremento ligero en 2-hidroxi y en 3-hidroxi butírico, y en los ácidos fumárico, succínico y 4-hidroxifenil láctico, junto con una excreción elevada de ácido láctico. En sangre la concentración de alanina estaba aumentada: 830 μ M (120-600). La presencia de aminoaciduria generalizada, glucosuria y reabsorción de fosfato en los túbulos renales del 51% eran compatibles con Síndrome de Toni-Debré-Fanconi renal. La paciente tuvo un ataque epiléptico parcial que fue tratado con fenobarbital y difenilhidantoína (ambos 5 mg/Kg/día). Con diagnóstico inicial de enfermedad mitocondrial, se le administró coenzima Q, vitamina K, ácido fólico, piridoxina, riboflavina, cobalamina, biotina, tiamina, carnitina y bicarbonato sódico. La colestasis fue tratada con ácido ursodeoxicólico. Como el bicarbonato sódico y las terapias orales no solucionaron la acidosis, se le realizó una diálisis peritoneal que desembocó en un fuerte ataque de peritonitis. Se inició tratamiento con dicloroacetato (DCA) con una dosis de 50 mg/Kg/día, que fue retirada a los 20 días debido a su ineffectividad. Se realizaron continuos tratamientos con bicarbonato sódico con una dosis inicial de 0,5 mEq/Kg/h, que fue aumentada hasta 1,25 mEq/Kg/h lo que controló finalmente la acidosis metabólica. El aumento de los niveles séricos de sodio (158 mEq/L) fue controlado con tiazida. Las infecciones fueron tratadas con antibióticos intravenosos y el paciente ganó 900 g en dos meses gracias a la nutrición parenteral. La terapia fue mantenida hasta los 7 meses, cuando falleció por infección de *Pseudomonas*. Las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial medidas en fibroblastos de la paciente mediante métodos establecidos (Martínez *et al.*, 2001) mostraron un déficit combinado de los complejos III y I (tabla 6).

1.2. PACIENTES 2 y 3

Los pacientes 2 y 3 (P2 y P3), hermanos, fueron previamente analizados y las características clínicas completas están descritas (De Meirleir *et al.*, 2003). En resumen, estos pacientes presentaban acidosis láctica, hipoglucemia, hipotonía, hepatopatía y un meconio grueso. Además, el paciente P2 presentaba encefalopatía, tubulopatía y fallo en el crecimiento.

1.3. PACIENTE 4

El paciente 4 (P4), de origen español, nació a las 35 semanas de embarazo mediante cesárea. Sus padres no son consanguíneos. Durante el periodo neonatal presentó colestasis, fallo hepático y sepsis; posteriormente desarrolló tubulopatía renal y retraso en el crecimiento. Los resultados de laboratorio mostraron un aumento de bilirrubina y de las actividades de las enzimas hepáticas, disfunción en parámetros relacionados con la coagulación, hipoglucemia y moderada acidosis láctica con valores en el rango 4,91-5,78 mM (normal <2,0 mM). A los 2,5 meses el paciente fue remitido a nuestro hospital por deshidratación, taquipnea e ictericia. El peso (2,860 g) y altura (51 cm) se encontraron por debajo de la normalidad. La exploración neurológica fue normal. Los datos de laboratorio mostraron anemia, acidosis láctica, disfunción hepática y niveles de electrolitos en suero y orina compatibles con un Síndrome de Toni-Debré-Fanconi. Se obtuvieron biopsias de piel, de músculo cuádriceps y de hígado. Histomorfológicamente el músculo esquelético fue normal. Las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial (Martínez *et al.*, 2001) mostraron un déficit aislado del complejo III en tejido muscular y un déficit combinado de los complejos III y IV en fibroblastos de piel (tablas 3 y 6). La actividad del complejo I no fue medida en músculo esquelético, dado que el pequeño tamaño de la pieza de tejido no permitió la medida completa de las actividades enzimáticas de los complejos de la cadena respiratoria. Los estudios histológicos hepáticos mostraron colestasis, fibrosis difusa, proliferación ductal y ausencia de hemosiderosis. Después de practicarle la biopsia de hígado el probando presentó peritonitis y sepsis, fue tratado con éxito y se recuperó a los 5 meses de edad. Un mes más tarde, la exploración clínica reveló la presencia de hipotonía muscular leve y microcefalia. La resonancia magnética nuclear (RMN) cerebral fue normal. A la edad de 11 meses, la condición clínica empeoró debido a fracaso hepático falleciendo por sepsis a pesar del tratamiento antibiótico y los cuidados intensivos.

1.4. PACIENTE 5

Niña de 19 meses, previamente sana y sin antecedentes familiares, que presentó un proceso febril banal junto a crisis epilépticas y deterioro progresivo de la conciencia. La enfermedad cursó con alteraciones del ritmo respiratorio y crisis distímicas. En varios exámenes se detectó disfunción hepática (isquemia/necrosis) en fase de resolución. Los estudios analíticos mostraron unas actividades de AST y ALT de 6000 U/L, y unos niveles de lactato sanguíneo entre 1,50 y 1,80 mM y lactato en líquido cefalorraquídeo (LCR) de 1,90-2,00 mM. El TAC craneal evidenció lesiones hipodensas sugestivas de necrosis en tronco, tálamos y ganglios basales (necrosis talámica bilateral con lesiones de la sustancia blanca). Todos estos hallazgos fueron compatibles con Síndrome de Leigh. A los 20 meses de edad se realizó a la paciente una biopsia

muscular del vasto externo para el estudio de la cadena respiratoria mitocondrial, observándose un déficit del aislado de complejo III. Histomorfológicamente el músculo mostró una miopatía con rasgos distróficos y alteraciones compatibles con patología mitocondrial: alteraciones en las tinciones de COX, NADH y SDH, acúmulos oxidativos subsarcolemales, y ocasionales fibras rojo rasgadas (FRR) COX negativas. Se le diagnosticó una encefalopatía severa fija y residual, secundaria a cuadro de encefalopatía aguda. La paciente cursó con tetraparesia espástica.

1.5. PACIENTE 6

El paciente 6 (P6) es un niño que presentó hipotonía, retraso psicomotor y hepatopatía a los 6 meses de edad. Era el segundo hijo de padres no consanguíneos sanos. Su hermano de 8 años es asintomático. El embarazo y el parto transcurrieron sin incidentes, excepto por un retraso en el crecimiento durante el último trimestre. El peso al nacer fue de 2.430 g (por debajo del percentil 10). Los exámenes clínicos mostraron una hipotonía leve generalizada. Los análisis de sangre mostraron una hipoglucemia leve (32 mg/dL) y niveles elevados de AST en suero (63 U/L, normal <40), de bilirrubina total (5,4 mg/dL, normal <1,1) y de lactato (4,9 mM, normal <2). Los análisis de ácidos orgánicos en orina mostraron niveles elevados de 3-hidroxi-propionato, 4-hidroxi-fenilacetato y 4-hidroxi-fenilpiruvato. La hipotonía muscular y el retraso del desarrollo motor persistieron durante los primeros meses de vida. A los 6 meses, la exploración clínica mostró soporte de la cabeza inestable, fijación de los ojos pobre y características dismórficas: el peso, la longitud y el perímetro craneal estaban entre los percentiles 3-10, *epicantus*, hipertriosis en la zona frontal de la cabeza y en los cuatro miembros, y distribución anormal de la grasa subcutánea (excesiva cantidad de grasa en la parte alta de la espalda, cuello, manos y pies y casi ausencia de grasa en brazos, codos, muslos y piernas). Los análisis de sangre revelaron niveles elevados de AST (155 U/L), ALT (320 U/L, normal <40) y lactato (6,77 mM). La RMN cerebral y el ecocardiograma fueron normales. La espectroscopia de resonancia magnética mostró un doble pico de lactato anormal en los ganglios basales. Ante la sospecha de enfermedad mitocondrial, se realizó una biopsia muscular del cuádriceps femoral. La histoquímica en músculo fue normal. El estudio de cadena respiratoria mitocondrial en homogenado muscular reveló un déficit enzimático aislado del complejo III (tablas 4 y 6). Después de la confirmación del diagnóstico, el paciente fue tratado con suplementos diarios de carnitina, coenzima Q, riboflavina, ácido ascórbico y vitamina K. A los cuatro años de edad las condiciones neurológicas han permanecido estables con un crecimiento moderado, retraso psicomotor, persistencia de las características dismórficas y sordera neurosensorial leve. El estudio del cabello, de la función renal y del metabolismo del hierro fueron normales. Las pruebas de función hepática fueron normales, a excepción de las actividades de AST y ALT en

suero (entre 100 y 300 U/L). La acidosis láctica se ha mantenido con niveles de lactato en suero entre 3,3- 5,5 mM.

1.6. PACIENTE 10

Los datos clínicos que disponemos de este paciente son escasos. La madre tuvo un aborto previo a los 2 meses de embarazo. Se trata de un niño de 7 años con acidosis láctica congénita que presentó ataques epilépticos y mioclonías al año de edad. La RMN cerebral fue normal. Se identificó un déficit enzimático aislado del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial en músculo esquelético, siendo anodinos los hallazgos histomorfológicos.

2. MATERIALES

2.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS

En esta tesis se han utilizado muestras procedentes de distintos tejidos de pacientes y controles: músculo esquelético (deltoides, bíceps branchii y bíceps/cuadriceps femoral), sangre, piel e hígado. La obtención de biopsias musculares y de piel, así como su estudio bioquímico, histoquímico y la extracción de ADN del tejido muscular se realizaron en el Hospital Universitario 12 de Octubre utilizando procedimientos descritos en el apartado de métodos. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes siguiendo normas del comité ético del Hospital 12 de Octubre de Madrid, compatibles con la declaración de Helsinki.

2.2. CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS

Para el desarrollo de esta tesis, se contó con 14 cultivos primarios de fibroblastos de piel procedentes de pacientes con déficit enzimático del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial en músculo, de manera aislada o combinada con déficit de los complejos I o IV. También se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos procedentes de 6 controles. Los explantes de los pacientes P5, P6, P18, P25, P26, P27 y P29, fueron realizados en el hospital Universitario 12 de Octubre y cultivados en el laboratorio según técnicas descritas en métodos. Las líneas celulares de los pacientes P4, P7, P23 y P28 fueron cedidas por la Dra. Celia Pérez Cerdá (CBM, Madrid) y las líneas de los pacientes P1, P2, P3 fueron amablemente cedidas por la Dra. Sara Seneca (Bélgica). Las líneas celulares de los individuos control fueron obtenidas en el propio hospital.

En la generación de híbridos transmitocondriales se utilizó la línea celular 143B 206 rho zero (ρ^0), derivada de la línea de osteosarcoma humano 143B 206 TK⁻, como donador nuclear. Estas

células fueron amablemente cedidas por la Dra. E. Gallardo y el Prof. R. Garesse (IIB, Madrid). Las líneas parentales de las que derivan proceden del laboratorio del Dr. J. Smeitink (NCMD, Nijmegen, Holanda). Además, se utilizaron fibroblastos enucleados del paciente 10, portador del polimorfismo en homocigosis m.15533A>G en el gen mitocondrial *CYTB*, como donador mitocondrial. Las líneas de híbridos control proceden del laboratorio del Prof. Rafael Garesse (IIB, Madrid) y del Dr. J. Smeitink (Nijmegen, Holanda).

2.3. REACTIVOS, SOLUCIONES Y TAMPONES

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico o de grado apto para la biología molecular y la bioquímica. La composición de las soluciones y tampones empleados más comúnmente, se realizó de acuerdo con Sambrook y Russel, 2001. De forma alternativa, la composición de medios específicos utilizados en los distintos experimentos se especifica en la descripción de los métodos o, en su defecto, en la bibliografía correspondiente.

2.4. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo como cebadores fueron sintetizados por Roche e Invitrogen. En las siguientes tablas se especifica el nombre, la secuencia en dirección 5'→3', la aplicación para la que fueron diseñados y su temperatura de *melting* (T_m) o anillamiento. Los oligonucleótidos fueron diseñados y analizados con el programa Oligo Analyzer 1.0.3, o bien seleccionados a partir de la base de datos Primer Bank (estos oligonucleótidos están señalados mediante un asterisco *), o bien seleccionados de un artículo (ver referencia). Cuando las regiones a secuenciar eran demasiado grandes se diseñaron oligonucleótidos entre fragmentos solapantes. Los oligonucleótidos sentido se indican con la letra “F” y los oligonucleótidos antisentido se indican con la letra “R”.

2.4.1. Análisis genético de *CYTB*

2.4.1.1. Oligonucleótidos usados en la secuenciación del gen *CYTB*.

Nombre	Secuencia	Aplicación	T _m
14671F	5' -CACGGACTACAACCACGACC-3'	Secuenciación <i>CYTB</i>	58 °C
15100R	5' -ATGTTTCAGGTTTCTGAGTAGAG-3'		
15003F	5' -CGCCTCAATATTCTTTATCTGC-3'	Secuenciación <i>CYTB</i>	58 °C
15492R-2	5' -AGGTCTGGTGAGAATAGTGTTA-3'		
15399F	5' -CACCTTCCACCCTTACTACAC-3'	Secuenciación <i>CYTB</i>	58 °C

15760R-2	5´-GATTCAGGTTAGAATGAGGAGG-3´		
15665F	5´-ATCCCCATCCTCCATATATCC-3´	Secuenciación <i>CYTB</i>	58 °C
15978R	5´-TGCTAATGGTGGAGTTAAAGAC-3´		

2.4.1.2. Oligonucleótidos usados para realizar el estudio de PCR-RFLP (ver abreviaturas) del polimorfismo m.15533A>G encontrado en el gen *CYTB*.

Nombre	Secuencia	Aplicación	Tm
3F-F	5´-CACTATTCTCACCAGACCTC-3´	RFLP m.15533A>G	58 °C
3F-R	5´-ACGCCTCCTAGTTTGTAGG-3´		

2.4.2. Análisis genético de *BCS1L*

2.4.2.1. Oligonucleótidos usados para secuenciar los exones de la secuencia genómica de *BCS1L*.

Nombre	Secuencia	Aplicación	Tm
I1BF I1BR	5´-GTTTTGTCTCTGTGGTTTTTCC-3´ 5´-CCCATCTGCTACTTTCTCCA-3´	Secuenciación exón 1	60 °C
I1CF I1CR	5´-GTCAGCTCACCTCCCTGC-3´ 5´-CCCCCTTACGTCCCCAATA-3´	Secuenciación exón 2	60 °C
E2F (de Lonlay <i>et al.</i> , 2001) E2R (de Lonlay <i>et al.</i> , 2001)	5´-TGTAAGGTTTGGTGTTCCTTT-3´ 5´-TTTCTACTCTCACAGCCCTCC-3´	Secuenciación exón 3	60 °C
E3F (de Lonlay <i>et al.</i> , 2001) E3R (de Lonlay <i>et al.</i> , 2001)	5´-TGGGTTTGACCCATTCACTC-3´ 5´-GGCCTGCTTATTCCAACCTTC-3´	Secuenciación exón 4	60 °C
E4F E4R	5´-CACCTAATTGAAGAATCAGCC-3´ 5´-TGGAGACCAACCTGTCCCT-3´	Secuenciación exón 5	60 °C
E5F (de Lonlay <i>et al.</i> , 2001) E5R (de Lonlay <i>et al.</i> , 2001)	5´-TTTCCGTACCAAGGTTATCAG-3´ 5´-TTCCAACCCTATCAGCCTAG-3´	Secuenciación exón 6	60 °C
E6F E6R	5´-TTCTCTCAACTTGGCAAAACG-3´ 5´-CCCAGGCATCTTCCACCAG-3´	Secuenciación exón 7	60 °C
E7F E7R	5´-GTTCTGGAGGAAGTGGAGTG-3´ 5´-GAAAGCAGGTCACACTAGCA-3´	Secuenciación exón 8	60 °C
I7F I7R	5´-TAGGTCGCCTCACCTTCAG-3´ 5´-GGACTGATCTGGTTTGTAGC-3´	Secuenciación exón 9 (fragmento a)	60 °C
I8F 3´ 1663 BCS1L	5´-AGGTTCTATCCAGGGCAGG-3´ 5´-CCTGTAGGCACCTGTGATT-3´	Secuenciación exón 9 (fragmento b)	60 °C

2.4.2.2. Oligonucleótidos usados para secuenciar los intrones de la secuencia genómica de *BCS1L*.

Nombre	Secuencia	Aplicación	Tm
I1BF I1BR	5´-GTTTTGTCTCTGTGGTTTTTCC-3´ 5´-CCCATCTGCTACTTTCTCCA-3´	Secuenciación intrón 1	60 °C
I1CF I1CR	5´-GTCAGCTCACCTCCCTGC-3´ 5´-CCCCCTTACGTCCCCAATA-3´	Secuenciación intrón 2 (fragmento a)	60 °C
I1DF I1DR	5´-GACAGTTTAGGTGGGAGGTAA-3´ 5´-AGTAGGGATTGTCCTTCAGAG-3´	Secuenciación intrón 2 (fragmento b)	60 °C
I2F I2R	5´-GCTCACCCGCCACAGTAC-3´ 5´-GGATGTTGAAGAAAACCTTTCG-3´	Secuenciación intrón 3	60 °C
I3F I3R	5´-TTGGGAATCTGTACCTTCA-3´ 5´-CGGCGGCGTGGATAGCC-3´	Secuenciación intrón 4	60 °C
I4F I4R	5´-TGACCGAATTGTCAGAGACG-3´ 5´-TTCCAACCCATCAGCCTAG-3´	Secuenciación intrón 5	60 °C
I5F I5R	5´-TTTCCGTACCAAGGTTATCAG-3´ 5´-GAGTCCGTGAGGCTCAGC-3´	Secuenciación intrón 6	60 °C
I6F I6R	5´-GACCGACTCAACCACCTGC-3´ 5´-CCACACCATCCAAGGCATTG-3´	Secuenciación intrón 7	60 °C
I7F I7R	5´-TAGGTCGCCTCACCTTCAG-3´ 5´-GGACTGATCTGGTTGTAGC-3´	Secuenciación intrón 8	60 °C

2.4.2.3. Oligonucleótidos usados en la secuenciación de la región 5´ no traducida (5´ UTR) del ARNm de *BCS1L*.

	Nombre	Secuencia	Aplicación	Tm
En secuencia genómica	5´UTR-F 5´UTR-R	5´-CAATCTGATAGTCCCTATTTCCA-3´ 5´-GCGTATTTCTTCTCTGGTGCC-3´	Secuenciación 5´ UTR (fragmento a)	60 °C
	E1F E1R	5´-TTATCGCTGTTCTGGGGAATC-3´ 5´-TCGGAAGGAGGTACTGAAGG-3´	Secuenciación 5´ UTR (fragmento b)	60 °C
	I1AF I1AR	5´-ATCATAAGAGCCAGCGAACT-3´ 5´-ATCTACTTCCCGCCACACC-3´	Secuenciación 5´ UTR (fragmento c)	60 °C
	I1BF I1BR	5´-GTTTTGTCTCTGTGGTTTTTCC-3´ 5´-CCCATCTGCTACTTTCTCCA-3´	Secuenciación 5´ UTR (fragmento d)	60 °C
	5´1663 BCS1L I1DR	5´-GGCGGATCTTATTGTCTACG-3´ 5´-AGTAGGGATTGTCCTTCAGAG-3´	Secuenciación 5´ UTR completo	60 °C

2.4.2.4. Oligonucleótidos usados en la secuenciación del ADN complementario (ADNc) de *BCS1L*.

Nombre	Secuencia	Aplicación	Tm
BCS1L-F1 BCS1L-R1	5´-GAGCTGGGGTTTTCGTAACAC-3´ 5´-CAGATAAAATGGTTTCCAGGGC-3´	Secuenciación ADNc (exón 3)	60 °C
BCS1L-F2 BCS1L-R2	5´-CGAGACTTCGTACCTTCAGC-3´ 5´-TGTAAGGAATGCCTCTGTCAG-3´	Secuenciación ADNc (desde exón 3 al 5-6)	60 °C
BCS1L-F3 BCS1L-R3	5´-GGTCTGGCTGACCGAATTG-3´ 5´-GTATCAGGGCAGGGTCCAG-3´	Secuenciación ADNc (desde el exón 5 al 9)	60 °C
BCS1L-F4 BCS1L-R4	5´-CCTTGATGGTGTGGCTTC-3´ 5´-AGTGTGGCAGATGTTTATTGAG-3´	Secuenciación ADNc (desde exón 8 al 9)	60 °C
5´ 1663 BCS1L 3´ 1663 BCS1L	5´-GGCGGATCTTATTGTCTACG-3´ 5´-CCTGTAGGCACCTGTGATT-3´	Secuenciación ADNc completo	60 °C

2.4.2.5. Oligonucleótidos usados para realizar el estudio de PCR-RFLP de las mutaciones g.1181A>G, g.1164C>G, c.148A>G y c.166C>T encontradas en el gen *BCS1L*.

Nombre	Secuencia	Aplicación	Tm
BCS1L RFLP F BCS1L RFLP R	5´-GTTGGAGGAGAGGTGTACTA-3´ 5´-CCTAACACTACCTGTTTAGCA-3´	RFLP g.1181A>G RFLP g.1164C>G	58 °C
E2F (de Lonlay <i>et al.</i> , 2001) E2R (de Lonlay <i>et al.</i> , 2001)	5´-TGTAAGGTTTGGTGTTCCTTT-3´ 5´-TTTCTACTCTCAGACCCCTCC-3´	RFLP c.148A>G	60 °C
E2F (de Lonlay <i>et al.</i> , 2001) I2R (de Lonlay <i>et al.</i> , 2001)	5´-TGTAAGGTTTGGTGTTCCTTT-3´ 5´-GGATGTTGAAGAAAACCTTTTCG-3´	RFLP c.166C>T	60 °C

2.4.2.6. Oligonucleótidos usados en la cuantificación del ARNm de *BCS1L* mediante PCR a tiempo real (RT-PCR).

Nombre	Secuencia	Aplicación	Tm
BCS1L RT 1F * I2R	5´-TGGTATCGGGGAAATGGATT-3´ 5´-GGATGTTGAAGAAAACCTTTTCG-3´	RT-PCR <i>BCS1L</i>	60 °C
Human β-Actin F * Human β-Actin R *	5´-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3´ 5´-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3´	RT-PCR <i>ACTB</i>	60 °C

2.5. ANTICUERPOS

Los análisis de *Western-blot* fueron realizados usando anticuerpos primarios monoclonales generados contra las siguientes subunidades de los complejos del sistema OXPHOS mitocondrial humano:

- Anti- NDUFS3 (30 kDa, Molecular Probes). Obtenido en ratón. Dilución 1:1000.
- Anti- NDUFA9 (39 kDa, Molecular Probes). Obtenido en ratón. Dilución 1:1000.
- Anti- MTND6 (20 kDa, Molecular Probes). Obtenido en ratón. Dilución 1:1000.
- Anti- sdhA (70 kDa, Molecular Probes). Obtenido en ratón. Dilución 1:40000.
- Anti- RISP (Rieske iron-sulfur protein, 29.6 kDa, Molecular Probes). Obtenido en ratón. Dilución 1:1000.
- Anti- Core 2 (48.5 kDa, Molecular Probes). Obtenido en ratón. Dilución 1:10000.
- Anti- COX Va (16.8 kDa, Molecular Probes). Obtenido en ratón. Dilución 1:4000.
- Anti- COX II (25.6 kDa, Molecular Probes). Obtenido en ratón. Dilución 1:1000.
- Anti- α -H⁺ ATPsintetasa (~50 kDa, Mitosciences). Concentración: 5 μ g/mL.

También se usaron los anticuerpos primarios generados contra las siguientes proteínas mitocondriales:

- Anti-BCS1L (~47 kDa, Abnova). Obtenido en ratón. Dilución 1:10000.
- Anti-BCS1L (57 kDa, Proteintech Europe Ltd). Obtenido en conejo. Dilución 1:1000.
- Anti-MnSOD (22 kDa, Sigma). Obtenido en conejo. Dilución 1:10000.
- Anti-Glutation Peroxidasa (GPx, ~28 kDa, Abcam). Obtenido en conejo. Dilución 1:10000.

También se usaron los anticuerpos primarios generados contra las siguientes proteínas citosólicas:

- Anti-BCS1L (~47 kDa, Abnova). Obtenido en ratón. Dilución 1:10000.
- Anti-Caspasa 3 (35/19/17 kDa, Cell Signaling Technology). Obtenido en conejo. Dilución 1:4000.
- Anti-Caspasa 9 (47/37/35 kDa, Cell Signaling Technology). Obtenido en ratón. Dilución 1:1000.
- Anti-Catalasa (60 kDa, Sigma). Obtenido en ratón. Dilución 1:10000.
- Anti- β -Actina (42 kDa, Sigma). Obtenido en ratón. Dilución 1:10000.

Como anticuerpos secundarios fueron usados:

- GAMPO (Molecular Probes). Anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa. Dilución 1:1500.
- GARPO (Molecular Probes). Anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa. Dilución 1:1500.
- Anti-IgG de conejo acoplado al fluorocromo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). Dilución 1:1000.
- Anti-IgG de cabra acoplado al fluorocromo Texas-Red (Mitosciences). Concentración: 2 µg/mL

3. MÉTODOS

Las técnicas básicas de biología molecular, tales como el clonaje de fragmentos de ADN, técnicas electroforéticas aplicadas al análisis de ácidos nucleicos y proteínas, los cultivos bacterianos, etc., se realizaron según describen Sambrook y colaboradores (Sambrook y Russell, 2001), o de acuerdo con los protocolos especificados en las citas correspondientes.

3.1. OBTENCIÓN DE BIOPSIAS DE PIEL

Las biopsias de piel se realizaron en condiciones de esterilidad máximas y llegaron al centro en tampón fosfato salino (PBS). Los explantes se lavaron con PBS estéril. Después se trocearon y se depositaron entre 2-3 trozos de explante por pocillo en una placa P6 (Nunc). La placa P6 se metió en el incubador (37 °C, 5% CO₂) hasta que se secaron los trozos de piel, de manera que quedaran fijados al fondo del pocillo. Después se añadió medio DMEM al 20% de suero fetal bovino (FBS), con cuidado de no despegar los explantes, y se dejaron en el incubador de 2 a 3 semanas hasta que crecieron los fibroblastos. En este momento se tripsinizaron los pocillos con fibroblastos, con cuidado de no levantar el explante y se procedió a la amplificación de la línea, creciendo los fibroblastos de una manera seriada en placas de mayor tamaño.

3.2. GENERACIÓN DE CÍBRIDOS TRANSMITOCONDRIALES

Para la generación de cíbridos transmitocondriales se siguió la técnica descrita por M.P. King y G. Attardi (King y Attardi, 1996) con ligeras modificaciones. Se partió de fibroblastos del paciente 10, portador de la mutación m.15533A>G en el gen mitocondrial *CYTB*. Como línea celular donadora del núcleo se utilizó la línea 143B TK⁻ rho zero (ρ^0) (figura 7).

Se sembraron 0.5×10^6 fibroblastos en una placa de cultivo de 35 mm, 24 horas antes de la enucleación. Las células fueron enucleadas mediante centrifugación en presencia de citocalasina B ($10 \mu\text{g/mL}$). Posteriormente, sobre las células enucleadas, se añadieron 1×10^6 células ρ^0 y el conjunto fue incubado durante 3 horas en estufa a 37°C en medio ρ^0 (ver apartado 3.3). Para la fusión, las células fueron lavadas dos veces en medio mínimo esencial (MEM) y expuestas durante 1 minuto a una solución de 50% polietilenglicol (PEG), 10% dimetil sulfóxido (DMSO). Se realizaron 3 lavados con 10% DMSO en MEM y las células fueron incubadas 24 horas en el medio adecuado para células ρ^0 .

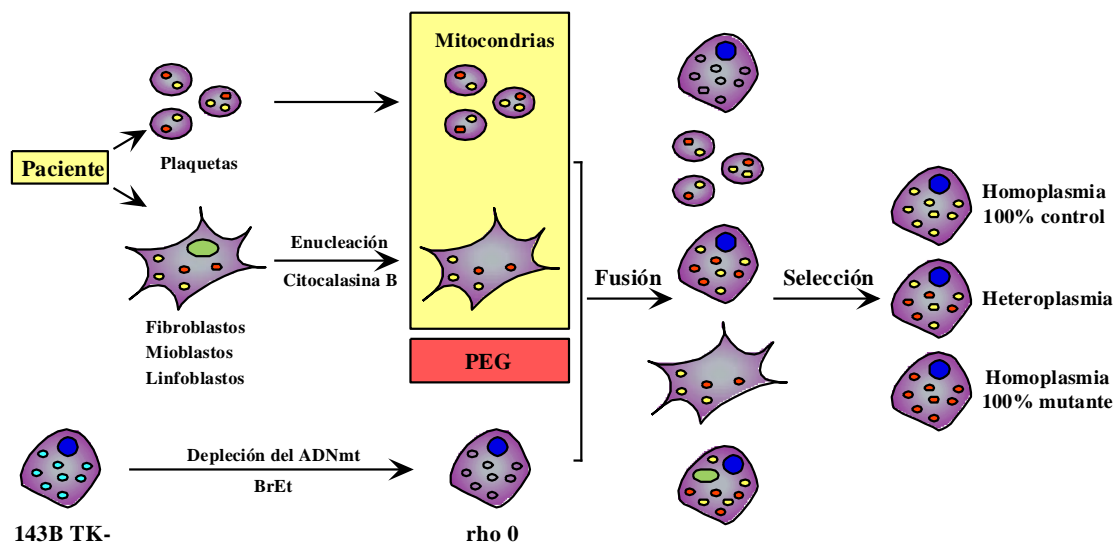


Figura 7. Esquema de la técnica de generación de híbridos transmitocondriales. En este trabajo, se utilizaron fibroblastos de pacientes como fuente de origen de las mitocondrias portadoras de las mutaciones en estudio. La enucleación de los fibroblastos, seguida por la fusión con las células ρ^0 , carentes de ADNmt, se realizó mediante el uso de polietilenglicol. La selección de clones permitió la obtención de líneas de células portadoras de la mutación mitocondrial en homoplasma. BrEt: tratamiento con bromuro de etidio.

Para la selección de los híbridos, las células fueron mantenidas durante 15 días en medio selectivo (ver apartado 3.3). La selección de clones a partir de célula aislada se realizó mediante la dilución de las células en placas de Petri P150 (aproximadamente crecen de 5-10 colonias por placa). Los clones independientes fueron tripsinizados en anillos de clonaje y se crecieron de forma independiente para su análisis posterior. Al menos 10 clones independientes fueron seleccionados y se estudiaron mediante PCR-RFLP para confirmar que eran portadores del ADNmt en estudio.

3.3. CULTIVOS CELULARES

Todas las células se cultivaron siguiendo protocolos estándar a 37 °C y 5% CO₂. Los fibroblastos se pasaron cuando alcanzaron el 90% de confluencia por tripsinización, mediante diluciones 1/3-1/4. Los cíbridos se pasaron cuando alcanzaron el 70% de confluencia por tripsinización, mediante diluciones 1/5-1/10.

Los medios usados para cada tipo de células fueron los siguientes:

- Medio fibroblastos: DMEM enriquecido en glucosa (Life Technologies) suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal (FBS), 2 mM L-Glutamina, 1 mM de Piruvato sódico, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina.
- Medio 143B TK⁻ ρ⁰ (medio ρ⁰): DMEM, 5% FBS, 50 µg/mL uridina, 100 µg/mL bromodeoxiuridina, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina.
- Medio selectivo de cíbridos: DMEM, 5% FBS, bromodeoxiuridina 100 µg/mL, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL.
- Medio cíbridos: DMEM, 5% FBS, 50 µg/mL uridina, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina.

3.4. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL.

Todas las medidas se realizaron en un homogenado muscular (ver su preparación en el apartado 3.16.2) o en un extracto celular total. Para preparar el extracto celular total se partió de células a una concentración de 15 millones de células/mL en tampón fosfato 20 mM a pH 7,0. A continuación se lisaron mediante sonicación (3 ciclos de 10 segundos a una amplitud de 15 micrones) y se congelaron a -80 °C hasta su procesamiento. La cantidad de proteínas del extracto celular se determinó usando el método Lowry.

La actividad de las enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial fue estudiada mediante espectrofotometría, según técnicas descritas previamente (DiMauro *et al.*, 1987; Martínez *et al.*, 2001) con ligeras modificaciones, usando un espectrofotómetro DU-650 (Beckman).

El complejo I (NADH:ubiquinona oxidoreductasa) se determinó midiendo la oxidación del NADH a 340 nm. El medio de reacción contenía 20 mM pH 8,0 tampón fosfato, 0,2 mM NADH, 1 mM NaN₃, 0,1% BSA-EDTA y 100 µM CoQ. La actividad deshidrogenasa del complejo I fue inhibida al 100% tras añadir 5 µM rotenona, quedando un 20% de actividad residual perteneciente a otras deshidrogenasas.

El complejo II (succinato deshidrogenasa) se determinó utilizando la reducción del aceptor artificial de electrones 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) a 600 nm. El medio de reacción contenía: 32 mM succinato, 50 mM pH 7,0 tampón fosfato, 1,5 mM KCN, 50 μ M CoQ₁ y 0,1 mM DCPIP.

El complejo III (ubiquinona-citocromo *c* oxidoreductasa) fue valorado según la aparición de citocromo *c* reducido a 550 nm, en una mezcla de reacción que contenía 50 mM pH 7,5 tampón fosfato, 2 mM NaN₃, 0,1% BSA-EDTA, 50 μ M citocromo *c* y 50 μ M decilubiquinol (DBH₂).

La actividad del complejo IV (citocromo *c* oxidasa) se determinó por la oxidación del citocromo *c* reducido a 550 nm en una solución con 10 mM pH 7,0 tampón fosfato y 80 μ M citocromo *c* reducido.

Todas las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C, excepto la del complejo IV que se incubó a 38 °C. Los resultados se normalizaron frente a la concentración de proteínas del extracto celular.

3.5. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD CITRATO SINTASA

La actividad de este enzima se cuantificó en función del cambio en la absorbancia a 412 nm producida por la reacción de 100 μ M DNTB (ácido 5-5' ditio bis 2-nitrobenzoico) con el coenzima A libre formada por la reacción de 350 μ g/mL acetil-CoA con 0,5 mM oxalacetato, en una solución con tampón 75 mM pH 8,0 Tris-HCl y 0,1% Tritón X-100. Los resultados fueron normalizados frente a la concentración de proteínas del extracto celular.

3.6. AISLAMIENTO DE ADN TOTAL DE CÉLULAS DE PIEL (FIBROBLASTOS), DE SANGRE Y DE MÚSCULO

Para el aislamiento de ADN total a partir de fibroblastos en cultivo se utilizó el kit Nucleon BACC3 for Blood & Cell Cultures (Amersham Biosciences) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para el aislamiento de ADN total a partir de sangre se utilizó el kit QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen) siguiendo las indicaciones del fabricante y para el aislamiento de ADN total a partir de músculo se utilizaron los métodos estándar de fenol/cloroformo (Sambrook y Russell, 2001). La concentración de los ADN obtenidos fue determinada espectrofotométricamente a 260 nm o mediante el uso del nanodrop (Nanodrop[®] Spectrophotometer ND-1000, version 3.3.0). El ADN así obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso.

3.7. AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y CONDICIONES DE PCR

Para llevar a cabo la amplificación de ácidos nucleicos (reacción necesaria para la generación de sondas, secuenciar o clonar posteriormente y realizar estudios de PCR-RFLP, entre otras), se preparó una mezcla de reacción que contenía los siguientes reactivos a las concentraciones finales indicadas: 1X NH_4 Reaction Buffer (Bioline), 1,5 mM MgCl_2 (Bioline), 0,05 U/ μL BioTaq DNA polymerase (Bioline), una mezcla 0,2 mM de los 2'-Deoxinucleótidos 5'-Trifosfato (timidina, citosina, guanina y adenina), 0,2 μM de cada oligonucleótido (sentido, antisentido) y 50-100 ng del ácido nucleico a secuenciar. En algunas reacciones fue necesario añadir DMSO (Sigma). Las condiciones de PCR fueron estándar en todas las reacciones (salvo en la PCR a tiempo real, ver apartado 3.13) y consistieron en los siguientes pasos: 4 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 10 segundos a 95 °C, 10 segundos a la T_m adecuada (ver apartado de materiales 2.4. para cada par de oligonucleótidos), 2-3 minutos a 72 °C, otro paso de 10 minutos a 72 °C y un paso final a 4 °C.

3.8. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE GELES DE AGAROSA

Con el fin de evitar contaminaciones de especies de ADN inespecíficas, se procedió a la purificación de las bandas correspondientes de ADN de geles de agarosa (Pronadisa). La purificación se realizó con el kit GPX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham), siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.9. SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Los fragmentos de ADN previamente amplificados (ver apartado 3.7), fueron purificados con el kit GPX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante, con el fin de eliminar los restos de oligonucleótidos y demás impurezas de la muestra. Después, se determinó la concentración de las muestras espectrofotométricamente mediante el uso del nanodrop (Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000, version 3.3.0). Para la reacción de secuenciación se añadieron 0,75 μL de Big Dye y 1,1 μL de 5X Sequencing Buffer, cuando los fragmentos a secuenciar tenían un tamaño ≤ 500 bases; o 1 μL de Big Dye y 1 μL de 5X Sequencing Buffer en el caso de que los fragmentos a secuenciar eran > 500 bases (ambos son reactivos del kit BigDye® Terminador v3.1 Cycle Sequencing, Applied Biosystems). Además de estos reactivos, a la reacción de secuenciación se le añadió el oligonucleótido correspondiente a la concentración final de 0,55 μM y 10 ng del ácido nucleico a secuenciar, siendo el volumen final de la reacción de 7,5 μL . Las condiciones utilizadas en la reacción de

secuenciación fueron 4 minutos a 94 °C, 25 ciclos de 10 segundos a 94 °C, 5 segundos a 55 °C, 4 minutos a 60 °C y un paso final a 4 °C. Después de la reacción de secuenciación el producto de PCR fue precipitado utilizando el kit BigDye® XTerminador™ Purification (Applied Biosystems). Para ello se añadieron sobre el producto de PCR 7,5 µL de BigDye® XTerminador™ Solution (resina) y 33,75 µL de diluyente (SAM™ Solution). La mezcla se agitó durante 30 minutos a 2500 rpm y después se centrifugó a 1000 g durante 2 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se diluyó a la mitad y se procedió a secuenciar.

La secuenciación de los distintos fragmentos de ADN se realizó utilizando el método de secuenciación automática en electroforesis capilar en un secuenciador ABI Prism System 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystem) en el Servicio de Secuenciación del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid).

Los resultados de secuenciación fueron analizados con el programa Chromas 2.33 y el alineamiento de secuencias se realizó con el programa Clustalw (NPS@: Network Protein Sequence Analysis (Combet *et al.*, 2000). Las secuencias originales de los genes a estudiar fueron buscadas en las bases de datos Ensembl Genome Browser y en GeneBank. En el caso del gen *BCS1L* se utilizó la secuencia AF516670 de GenBank.

3.10. DETECCIÓN DE MUTACIONES POR PCR-RFLP

3.10.1. Detección del polimorfismo m.15533A>G en el gen *CYTB* detectada en el paciente 10

Para la amplificación del fragmento de ADN se usaron los oligonucleótidos 3F-F y 3F-R (apartado 2.4.1.2).

Este cambio introduce un sitio de corte para la enzima *DdeI* (New England Biolabs, NEB) y elimina un sitio de corte para la enzima *MseI* (NEB) (figura 8). El patrón de bandas resultante se muestra en la siguiente figura para los casos de una muestra control (C) y una muestra con el cambio en homocigosis:

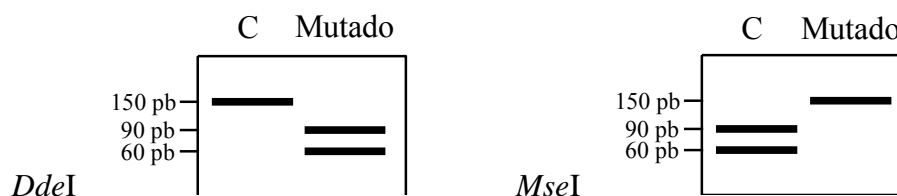


Figura 8. Patrón de bandas de la digestión con *DdeI* y *MseI* para la detección del polimorfismo m.15533A>G

3.10.2. Detección de las mutaciones en el gen *BCS1L* identificadas en el paciente 4

3.10.2.1. Detección de la mutación g.1181A>G en la secuencia genómica de *BCS1L*

Para la amplificación del fragmento de ADN se usaron los oligonucleótidos BCS1L RFLP F y BCS1L RFLP R (apartado 2.4.2.5). Esta mutación introduce un sitio de corte para la enzima *DraIII* (NEB) (figura 9). El patrón de bandas resultante se muestra en la siguiente figura para los casos de una muestra control (C) y una muestra con la mutación en heterocigosis:

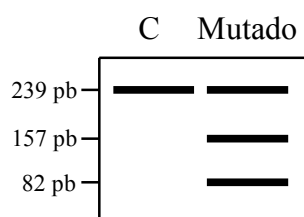


Figura 9. Patrón de bandas de la digestión con *DraIII* para la detección de la mutación g.1181A>G

3.10.2.2. Detección de la mutación g.1164C>G en la secuencia genómica de *BCS1L*

Para la amplificación del fragmento de ADN se usaron los oligonucleótidos BCS1L RFLP F y BCS1L RFLP R (apartado 2.4.2.5). Esta mutación introduce un sitio de corte para la enzima *NlaIV* (NEB) (figura 10). El patrón de bandas resultante se muestra en la siguiente figura para los casos de una muestra control (C) y una muestra con la mutación en heterocigosis:

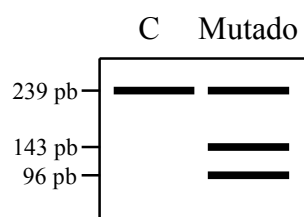


Figura 10. Patrón de bandas de la digestión con *NlaIV* para la detección de la mutación g.1164C>G

3.10.2.3. Detección de la mutación c.166C>T (p.R56X) en la secuencia genómica y en el ADNc de *BCS1L*

Para la amplificación del fragmento de ADN se usaron los oligonucleótidos E2F y I2R (apartado 2.4.2.5). Esta mutación elimina un sitio de corte para la enzima *AvaI* (NEB) (figura 11). El patrón de bandas resultante se muestra en la siguiente figura para los casos de una

muestra control (C) y una muestra con la mutación en heterocigosis, tanto en la secuencia genómica (ADNg) como en el ADN complementario (ADNc):

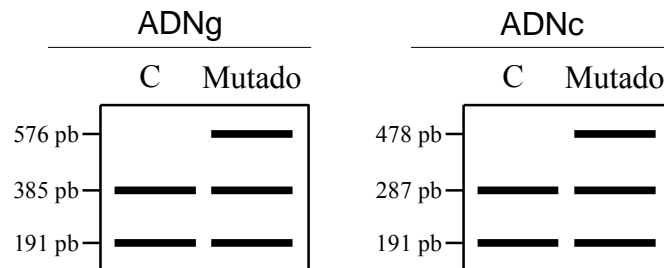


Figura 11. Patrón de bandas de la digestión con *AvaI* para la detección de la mutación c.166C>T (p.R56X)

3.10.3. Detección de la mutación c.148A>G (p.T50A) del gen *BCS1L* detectada en el paciente 6

Para la amplificación del fragmento de ADN se usaron los oligonucleótidos E2F y E2R (apartado 2.4.2.5). Esta mutación elimina un sitio de corte para la enzima *BclI* (NEB) (figura 12). El patrón de bandas resultante se muestra en la siguiente figura para los casos de una muestra control (C) y una muestra con la mutación en homocigosis:

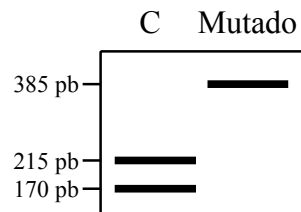


Figura 12. Patrón de bandas de la digestión con *BclI* para la detección de la mutación c.148A>G (p.T50A)

3.11. AISLAMIENTO DE ARN TOTAL DE FIBROBLASTOS

Para el aislamiento de ARN total a partir de células en cultivo se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración de los ARN obtenidos fue determinada espectrofotométricamente mediante el uso del nanodrop (Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000, version 3.3.0). El ARN así obtenido se almacenó a -80 °C hasta su uso.

3.12. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DEL ARNm DEL GEN *BCS1L* MEDIANTE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-PCR)

La cuantificación relativa del ARNm de *BCS1L* frente al ARNm de la subunidad β de la actina (*ACTB*) se realizó por RT-PCR utilizando el equipo Applied Biosystems HT 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El ARN total de fibroblastos fue extraído y cuantificado según protocolos descritos con anterioridad (apartado 3.11). Se usó 1 μ g de ARN total de cada muestra para obtener el ADNc necesario para las reacciones de RT-PCR, mediante el uso del kit High Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para llevar a cabo la reacción de RT-PCR se utilizó la mezcla FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Applied Science). Las reacciones de RT-PCR fueron realizadas en un volumen total de 10 μ L. La mezcla de la reacción contenía una alícuota de 1 μ L de ADNc, 0,5 μ M de cada oligonucleótido, 5 μ L de *SYBR Green* y H₂O hasta 10 μ L. El amplicón de *BCS1L* fue generado por los oligonucleótidos **BCS1L RT 1F** e I2R y, el amplicón de *ACTB* fue generado por los oligonucleótidos **Human β -Actin F** y **Human β -Actin R**. Los oligonucleótidos marcados en negrita, descritos en el apartado 2.4.2.6 de materiales, fueron seleccionados de la base de datos Primer Bank. Los códigos de identificación de dichos oligonucleótidos en la base de datos Primer Bank son: BCS1L RT 1F (ID: 4757852a3) y, Human β -Actin F y Human β -Actin R (ID: 4501885a1). El oligo I2R (para el gen *BCS1L*) fue diseñado para el experimento y, posteriormente, analizado con el software Oligo Analyzer 1.0.3. Las condiciones de la reacción de amplificación fueron: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 30 segundos a 72 °C. El programa de PCR fue seguido por un programa de curva de *melting* consistente en una medida continua de pasos desde 0,5 °C hasta 95 °C, para asegurar la especificidad de los productos de PCR. Las curvas de calibración que fueron utilizadas para cuantificar el número de copias de ARNm de *BCS1L* respecto al ARNm de *ACTB*, se basaron en la relación lineal entre los puntos de corte de los ciclos y el logaritmo del número de copias inicial. Todas las muestras fueron testadas por triplicado a dos concentraciones (diluciones diferentes) de ADNc en cada experimento y los resultados se muestran como una media de 3 experimentos independientes. La cuantificación relativa se expresa como $2^{-(\Delta C_{t\text{paciente}} - \Delta C_{t\text{control}})}$, donde $\Delta C_t = C_t \text{ BCS1L} - C_t \text{ ACTB}$ para el paciente y para el control. El n° de ciclo, C_t , representa el ciclo en el que la señal de fluorescencia cruza un cierto umbral que está en correlación con la fluorescencia de fondo del ensayo. El valor del paciente se expresa como un porcentaje del valor control.

3.13. CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN 5' UTR DEL ARNm DE *BCS1L*

Para la caracterización de la región 5' UTR del ARNm de *BCS1L*, se amplificaron fragmentos de ADNc con los oligonucleótidos 5'1663 BCS1L y I1DR, descritos en el apartado de materiales 2.4.2.3. Los fragmentos parciales de ADNc se purificaron mediante extracción en gel de agarosa y se clonaron en el vector pGEM®-T easy (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la clonación y posterior amplificación de los fragmentos de ADNc clonados, se utilizaron las cepas bacterianas JM109 (Promega); utilizándose el sistema IPTG (Isopropil- β -D-tio-galactósido, Fermentas) y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido, Nalgene, Promega) para la selección positiva de los clones (Sambrook y Russell, 2001). Los fragmentos de ADNc clonados y amplificados fueron extraídos de las bacterias con el kit Wizard® plus SV minipreps DNA Purification System (Promega), se cuantificaron y secuenciaron las dos cadenas de cada fragmento amplificado (ver apartado 3.9).

3.14. PREPARACIÓN DE LISADOS CELULARES Y SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Los fibroblastos en cultivo se tripsinizaron y se lavaron con PBS. Posteriormente, se resuspendieron en 50 μ L de PBS + 15 μ L de n-dodecyl β -D-maltoside (DDM) al 20%. Tras 15 minutos en hielo, se centrifugaron a 10000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó utilizando el MicroBCA Protein Assay Kit (Pierce). Se añadieron 120 μ L de 2X Laemmli Sample Buffer (Biorad) por muestra y se incubaron alrededor de 2 horas a 37 °C. Las muestras fueron guardadas a -20 °C hasta su uso. De acuerdo con protocolos rutinarios (Sambrook y Russell, 2001), se separaron 20 μ g de proteína de cada muestra mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%.

3.15. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA ENSAYOS DE ELECTROFORESIS AZUL NATIVA (*BLUE NATIVE*)

3.15.1. Aislamiento de mitocondrias a partir de fibroblastos o cíbridos

Las membranas mitocondriales se aislaron de los cultivos celulares, como se ha descrito previamente (Nijtmans *et al.*, 2002) con modificaciones menores:

Los fibroblastos-cíbridos fueron cultivados hasta que las células alcanzaron el 90 ó 70% de confluencia, respectivamente. Las células fueron recogidas con tripsina, lavadas dos veces con tampón Fosfato Salino (PBS) y resuspendidas en 100 μ L PBS + 100 μ L de solución de

digitonina (4 mg/mL). Esta solución celular se mantuvo en hielo durante 10 minutos para disolver las membranas. Se añadió 1 mL de PBS frío a las células, las cuales fueron centrifugadas durante 10 minutos a 10000 rpm a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet fue lavado una vez más en 1 mL de PBS frío. Para la preparación de los complejos mitocondriales en condiciones nativas, los pellets fueron solubilizados en 100 µL de tampón (1,5 M de ácido 6-amino hexanoico (Sigma), 50 mM Bis-Tris (Sigma) pH 7,0). La concentración de proteína fue determinada utilizando el kit MicroBCA Protein Assay (Pierce). Después, se añadió una solución de n-dodecyl β-D-maltosido (DDM, Sigma) al 2% (p/v) y las células fueron incubadas en hielo durante 10 minutos. Después de centrifugar durante 30 minutos a 13000 rpm a 4 °C se recogió el sobrenadante, al cual se añadieron 10 µL de tampón de carga (750 mM de ácido 6-amino hexanoico, 50 mM Bis-Tris, 0,5 mM EDTA, 5% Serva Blue G-250 (Serva)).

3.15.2. Preparación de homogenados musculares

Se colocó el trozo de músculo sobre papel secante, para eliminar el exceso de agua de descongelación. Se retiraron los restos de grasa, tejido conjuntivo, hilos de sutura, etc. Se pesó (mínimo 30 mg). Se añadieron 15 µL de la solución (20 mM de tampón fosfato potásico a pH 7,0)/mg de músculo en el homogeneizador (dilución 1/15-p/v-) y se homogeneizó el músculo en hielo. Se centrifugó a 800 g, 10 minutos a 4 °C. Se recogió el sobrenadante. La concentración de proteína fue determinada utilizando el método Lowry.

3.15.3. Aislamiento de mitocondrias a partir de homogenados musculares

En el caso de homogenados musculares (extraídos previamente para la medición de las actividades enzimáticas de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, ver apartados 3.15.2 y 3.4), las membranas mitocondriales fueron aisladas como se ha descrito previamente en el apartado 3.15.1., con ligeras modificaciones:

A 50 µL de homogenado muscular se le añadieron 200 µL de una solución (0,2 mM EDTA, 0,25 M sacarosa, 10 mM pH 8,0 Tris-HCl y 1 mM PMSF). Se centrifugó durante 15 minutos a 13500 rpm a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Para la preparación de los complejos mitocondriales en condiciones nativas, los pellets fueron solubilizados en 50 µL de tampón (1,5 M de ácido 6-amino hexanoico, 50 mM pH 7,0 Bis-Tris). La concentración de proteína fue determinada utilizando el kit MicroBCA Protein Assay (Pierce). Después, se añadió una solución de n-dodecyl β-D-maltosido (DDM) al 2% (p/v) y las células fueron incubadas en hielo durante 10 minutos. Después de centrifugar durante 30 minutos a 13000 rpm a 4 °C se recogió

el sobrenadante, al cual se añadieron 5 μ L de tampón de carga (750 mM de ácido 6-amino hexanoico, 50 mM Bis-Tris, 0,5 mM EDTA, 5% Serva Blue G-250).

3.16. ELECTROFORESIS BIDIMENSIONALES EN CONDICIONES NATIVAS (*BLUE NATIVE*) Y ENSAYOS DE ACTIVIDAD EN GEL (IGAs)

La electroforesis bidimensional azul nativa (*blue native*) es una técnica que permite separar los diferentes complejos de la cadena respiratoria, funcionalmente activos con su conformación nativa, en una primera dimensión (1D). Posteriormente, las diferentes subunidades de los complejos de la cadena respiratoria se separan en una segunda dimensión, que se lleva a cabo en condiciones desnaturizantes.

3.16.1. Electroforesis en primera dimensión (1D)

Para la **primera dimensión (1D)** se realizaron geles *blue native* con un gradiente del 4-15% de acrilamida/bisacrilamida (29:1, Biorad), utilizando separadores de 1,5 mm. Se cargaron 40 μ g de proteína mitocondrial utilizando como ánodo el tampón A (50 mM Bis-Tris, pH 7,0) y como cátodo el tampón C1 (15 mM Bis-Tris/ 50mM tricina a pH7.0, que contenía un 0.02% de Serva Blue G-250). Las proteínas se separaron a 30 V durante 30 minutos y a 80 V hasta que el frente de azul de *coomassie* se salió del gel. A la mitad de la electroforesis se cambió el tampón C1 por el tampón C2 (15 mM Bis-Tris/ 50 mM tricina, pH 7,0) para eliminar el exceso de azul de los geles. Las 1D se realizaron por triplicado; uno de los geles se utilizó para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (ver apartado 3.18) y poder analizar el ensamblaje de los complejos en su conformación nativa, otro triplicado fue procesado para una **segunda dimensión (2D)** al 10% SDS-PAGE siguiendo los métodos descritos en el apartado 3.16.2. El tercer triplicado se utilizó para realizar los ensayos de actividad en gel (IGA) de los complejos I y IV mitocondriales (apartado 3.17).

3.16.2. Electroforesis en segunda dimensión (2D)

Un gel *blue native* de 1D fue procesado para una 2D con el fin de separar las distintas subunidades de los complejos de la cadena respiratoria. Para ello se cortó con un bisturí una banda del gel de 1D y se rotó 90° en un cristal (figura 13).

La banda se incubó durante una hora con una solución desnaturizante (1% SDS, 1% β -mercaptoetanol). El exceso de solución desnaturizante se eliminó utilizando papel de filtro. Este paso es esencial pues el β -mercaptoetanol inhibe la polimerización de la acrilamida del gel

separador de la 2D. Posteriormente se montó el sistema de electroforesis, utilizando cristales con separadores de 0,75 mm. El gel separador se preparó al 10% de acrilamida/bisacrilamida y 0,1% SDS; y el gel concentrante se preparó al 4% de acrilamida/bisacrilamida con un 0,1% SDS. Dicho gel se añadió alrededor de la banda de 1D. Como ánodo se utilizó el tampón A-SDS (0,2 M pH 8,9 Tris-HCl) y como cátodo el tampón C-SDS (0,1 M Bis-Tris/ 0,1 M tricina a pH 8,2, que contenía un 0,1% de SDS). Las proteínas se separaron a 30 V durante 30 minutos y a 80 V durante 2-4h.

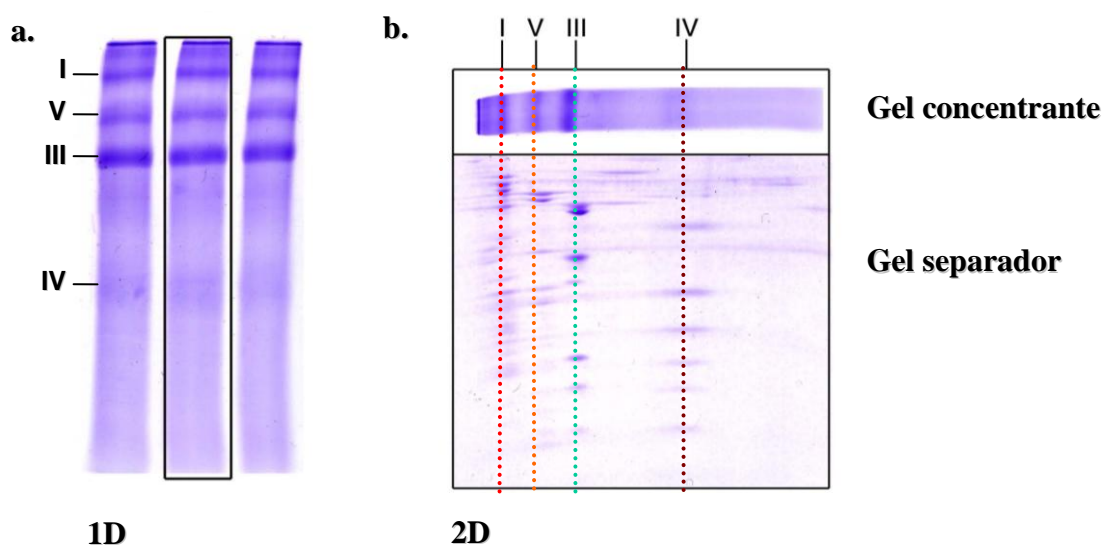


Figura 13. Electroforesis *blue native* bidimensional. **a. Primera dimensión (1D)** realizada en condiciones nativas. Los diferentes complejos de la cadena respiratoria mitocondrial son separados en un gel de gradiente de acrilamida/bisacrilamida. **b. Segunda dimensión (2D)** realizada en un gel 10% SDS-PAGE para analizar las diferentes subunidades de los complejos de la cadena respiratoria. Para ello una banda de un gel de 1D se corta, se rota 90° y se inserta en el gel concentrante. Las proteínas son posteriormente separadas en el gel separador. **I:** complejo I, **III:** complejo III, **IV:** complejo IV y **V:** complejo V mitocondrial (Modificado de Nijtmans *et al.*, 2002).

3.17. ENSAYOS DE ACTIVIDAD EN GEL (IGAs)

Para el **IGA del complejo I** los geles fueron incubados 2 horas a temperatura ambiente con la siguiente solución: 2 mM pH 7,4 Tris-HCl, 0,1 mg/mL NADH y 2,5 mg/mL NTB (azul de *nitrotetrazolium*, Sigma). Los geles se lavaron en agua destilada y se escanearon inmediatamente. Para el **IGA del complejo IV** los geles se incubaron 48 horas a 37 °C en agitación, con una solución que contenía 10 mg de 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma), 1 nM de catalasa (20 µg/mL, Sigma), 20 mg de citocromo *c* (Sigma) y 1,5 g de sacarosa (Sigma) disueltos en 18 mL de 0,05 M pH 7,4 de buffer fosfato. Después de la incubación los geles se lavaron y se escanearon inmediatamente.

3.18. TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS UNIDAS A MEMBRANA (WESTERN BLOT)

Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa PROTAN[®] (Schleider & Schuell) a 25 V, a temperatura ambiente durante toda la noche e hibridadas a anticuerpos específicos.

Las membranas se preincubaron durante 14-16 horas en solución de bloqueo (1X PBS, 0.1% Tween 20, 5% leche desnatada en polvo) y se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en las condiciones de dilución y tiempo preestablecidas para cada uno de ellos (ver apartado 2.5). Las membranas se lavaron tres veces con 0,1% Tween 20 en PBS y se incubaron utilizando una dilución 1:1500 del anticuerpo secundario correspondiente, durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo. La membrana se lavó tres veces con 0.1% Tween 20 en PBS. Como reactivo de revelado se utilizó el kit ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham). La cuantificación de la señal fue realizada mediante el software de análisis de imágenes Image J 1.36b (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

3.19. MEDIDA DE LA PRODUCCIÓN DE H₂O₂ EN CÉLULAS VIVAS

La medida de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se realizó en fibroblastos, utilizando el reactivo diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA, Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. El diacetato de diclorofluoresceína es incorporado por la célula y una vez en el citosol, las esterasas celulares rompen el enlace éster de los acetatos generando diclorofluoresceína, que es polar y no puede atravesar la membrana. La diclorofluoresceína es entonces oxidada por las especies reactivas del oxígeno, fundamentalmente el peróxido de hidrógeno, y emite en el canal de luz verde (máximo de emisión a los 522 nm). Estas medidas fueron llevadas a cabo mediante dos técnicas diferentes:

3.19.1. Citometría de flujo

Para ello se sembraron 1×10^6 fibroblastos en medio de cultivo (ver apartado 3.3) hasta llegar a un 65% de confluencia. El día de la medida los fibroblastos fueron tripsinizados y lavados con PBS. Después se incubaron con 10 μ M DCFDA en PBS durante 30 minutos a 37 °C en oscuridad. Las células fueron lavadas y resuspendidas en 500 μ L de PBS. Para medir la síntesis de ROS intracelular la diclorofluoresceína fue excitada a 488 nm por un láser 15 mW y la fluorescencia emitida fue medida mediante citometría de flujo en un FacScan (Becton Dickinson), analizándose 1×10^5 células por muestra mediante el uso del software Cell Quest (Becton Dickinson). Como control negativo se utilizaron células con el mismo tratamiento a las

cuales no se les añadió el fluorocromo (sin DCFDA) y como control positivo se utilizaron células a las cuales se les añadió 200 μM de H_2O_2 .

3.19.2. Microscopía confocal

Para el análisis de producción de H_2O_2 los fibroblastos cultivados sobre cubreobjetos de vidrio, se incubaron con 5 μM de DCFDA en DMEM, a 37 °C durante 20 minutos. Tras las incubaciones, las células se lavaron 3 veces con PBS a 37 °C y los cubres se montaron invertidos sobre una gota de PBS colocada en un portaobjetos. Estas preparaciones se sellaron con una mezcla caliente de vaselina:lanolina:parafina (1:1:1) y se observaron inmediatamente con un objetivo plan-neofluor 20x más un zoom digital 2x en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 META. Como control de la autofluorescencia de las células en el canal verde se utilizaron células sin teñir.

3.20. MORFOLOGÍA DE LA RED MITOCONDRIAL

Se estudió la disposición de la red mitocondrial y la localización subcelular de BCS1L en fibroblastos, mediante inmunofluorescencia doble contra BCS1L y la subunidad α del complejo V del sistema OXPHOS. Para ello los fibroblastos se crecieron sobre cubreobjetos estériles y se fijaron con 2% de paraformaldehído en DMEM durante 15 min a 37 °C. Posteriormente, las células se permeabilizaron durante 15 min con 0.1% Triton-X 100 y se bloquearon con 10% de suero de cabra en PBS durante 60 min a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron a 4 °C durante toda la noche con una dilución 1:50 del anticuerpo policlonal de conejo contra BCS1L (Proteintech Group Inc.) y con una dilución del anticuerpo contra la subunidad α del complejo V (Mitosciences) a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$, con el que se marca toda la red mitocondrial. Tras lavar el exceso de anticuerpos primarios, los fibroblastos se incubaron con una dilución 1:1000 de un anticuerpo de cabra contra inmunoglobulina de conejo acoplado al fluorocromo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), y una inmunoglobulina de cabra contra anticuerpo de ratón unida al fluorocromo Texas-Red a una concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ (Mitosciences), durante 60 min a temperatura ambiente. Tras lavar el exceso de anticuerpos secundarios, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con ProLong Gold y se observaron con un objetivo plan-apocromático 63x en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 META.

3.21. ENSAYO DE MUERTE CELULAR

La muerte celular eucariótica puede ocurrir de dos maneras, mediante necrosis o apoptosis (muerte celular programada). La apoptosis se caracteriza porque la célula se encoge dando lugar a unas burbujas en la superficie celular en un proceso denominado zeiosis, la condensación del citoplasma y la activación de una endonucleasa endógena así como proteasas específicas. La endonucleasa endógena es dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} y corta ADN de doble cadena en las regiones internucleosomales más accesibles, generando mono- y oligonucleosomas. En contraste, el ADN de los nucleosomas se encuentra muy compactado gracias a las histonas H2A, H2B, H3 y H4, de manera que queda protegido frente al corte por endonucleasa (Burgoyne *et al.*, 1974; Stach *et al.*, 1979). Los fragmentos de ADN producidos son múltiples discretos de 180 pb. El enriquecimiento de mono- y oligonucleosomas en el citoplasma de las células apoptóticas es debido al hecho de que la degradación del ADN ocurre varias horas antes de la rotura de la membrana plasmática (Duke y Cohen, 1986; Bonfoco *et al.*, 1995; Terui *et al.*, 1995). Para realizar el ensayo de muerte celular se utilizó el kit Cell Death Detection ELISA^{PLUS} 10X (Roche). El ensayo está basado en la cuantificación de ADN fragmentado, mono- y oligonucleosomas en la fracción citoplasmática de los lisados celulares, mediante inmunodetección utilizando anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra el ADN y las histonas. Para ello se cultivaron $0,5 \times 10^6$, hasta llegar a un 90% de confluencia. El día de la medida las células fueron recogidas mediante tripsinización y lavadas con PBS. Se procedió siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados y discusión

CAPÍTULO 1:

Identificación de la causa genética responsable del déficit enzimático del complejo III

Una de las líneas de este estudio se centra en el análisis de la fisiopatogenia de las enfermedades mitocondriales mediante la identificación y caracterización de mutaciones, tanto en el ADNmt como en genes nucleares, que causan una disfunción de la actividad enzimática del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial. Se comenzó con aquellos genes donde se han descrito la mayoría de mutaciones relacionadas con un déficit del complejo III, el gen mitocondrial *CYTB* y el gen nuclear *BCS1L*, que codifica un factor de ensamblaje de dicho complejo.

Los criterios que se han utilizado para definir la patogenicidad de una nueva mutación han sido: i) que la mutación afecte a un sitio conservado evolutivamente, ii) la presencia de otras mutaciones patogénicas, previamente descritas, en regiones vecinas a la nueva mutación, y iii) la ausencia de la mutación en al menos 400 alelos control procedentes de sujetos sanos. Para ello se seleccionaron 200 individuos para los que no existía evidencia clínica, histológica o bioquímica de sufrir una patología mitocondrial, y con unas características demográficas en cuanto a edad y sexo similares a la de los pacientes incluidos en el estudio.

1.1. SECUENCIACIÓN DEL GEN *CYTB*

Se secuenció completamente el gen *CYTB* codificado por el ADN mitocondrial en 33 pacientes con déficit enzimático del complejo III aislado o déficit combinado con los complejos I ó IV. No se identificaron mutaciones presumiblemente patogénicas en dicho gen. Únicamente en el caso del paciente P10 se logró identificar una variante genética en *CYTB*, no descrita previamente en las bases de datos, y se procedió a su caracterización.

1.1.1. Caracterización de la variante genética encontrada en el gen *CYTB* en el paciente P10

1.1.1.1. **Análisis del ADNmt en el paciente P10**

La secuenciación completa del ADNmt, realizada por el servicio Secugen (CIB, Madrid), descartó la presencia de mutaciones patogénicas, salvo un único cambio nucleotídico encontrado en el gen *CYTB* en el paciente P10. El análisis completo del ADNmt permitió determinar el haplogrupo mitocondrial de este paciente (**H2**), siguiendo las indicaciones que aparecen en la base de datos: Human Mitochondrial Genome Database (<http://www.genpat.uu.se/mtDB/menuframe.php>). La secuenciación directa del gen *CYTB* reveló que el probando era homoplásmico para el cambio nucleotídico m.15533A>G (figura 14A), el cual estaba ausente en 200 secuencias control de origen español y tampoco apareció en ninguna base de datos de polimorfismos (SNP). La mutación predice la sustitución del aminoácido asparagina por ácido aspártico en la posición 263 de la proteína (p.N263D). Dicha sustitución modifica un residuo aminoacídico poco conservado a lo largo de la evolución,

aunque se halla conservado en la mayoría de los mamíferos y localizado en una región altamente conservada en las especies analizadas (figura 14B).

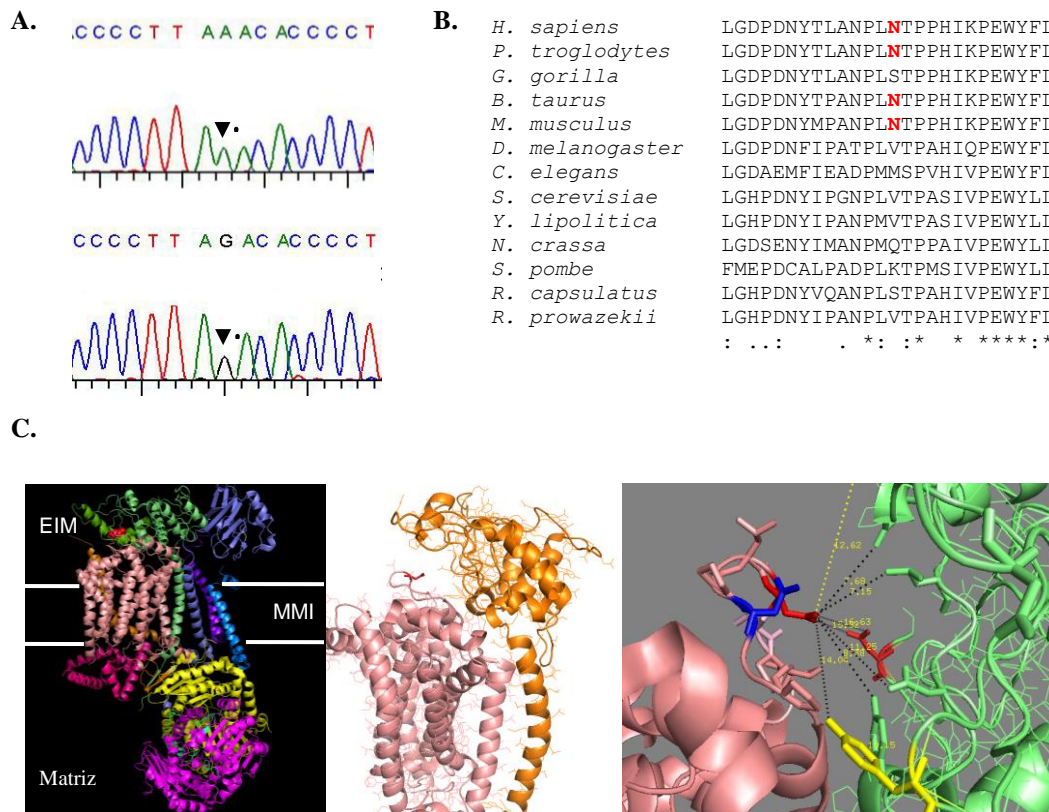


Figura 14. **A.** Electroferograma que muestra un fragmento del gen mitocondrial *CYTB* en ADN de músculo control (panel superior) y del paciente P10 (panel inferior). El paciente tiene un cambio nucleotídico A>G en homocigosis en la posición 15533 del genoma mitocondrial, lo que se ha indicado mediante flechas. **B.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de un fragmento de *CYTB* de distintas especies. Se resalta en rojo el aminoácido que ocupa la posición 263, que en el paciente P10 pasaría a ser N>D. Los asteriscos indican las posiciones de aminoácidos conservados en todas las especies. Los símbolos “:” y “.” indican aminoácidos conservados en casi todas las especies. **C.** Imágenes que muestran la estructura 3D de la proteína *CYTB*: completa (panel izquierdo, en rosa) o parcial (paneles central y derecho). EIM: espacio intermembrana, MMI: membrana mitocondrial interna. En el panel izquierdo, las bolitas rojas indican la posición del aminoácido 263 mutado en el paciente P10 y la estructura 3D verde presente en el EIM corresponde a la subunidad *CYC1*. En el panel central se da una visión del bucle exterior donde quedaría el aminoácido 263 mutado en el paciente P10 (en rojo). En el panel derecho se muestran las interacciones que tendrían lugar entre el aminoácido 263 (rojo) con los aminoácidos de su entorno en una vista muy aumentada. El aminoácido 260 se ha señalado en azul; en este aminoácido se ha descrito una mutación no deletérea que da lugar al cambio N260D (Fuku *et al.*, 2002). Estas imágenes fueron obtenidas mediante el programa informático Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) y cedidas por el Dr. Toni Gabaldón (CRG “Centro de Regulación Genómica”, Barcelona).

El aminoácido 263 estaría ubicado en un bucle que hace la proteína en el espacio intermembrana, en una parte que está enfrentada a la subunidad *CYC1* del complejo III (figura 14C). En los paneles central y derecho de la figura 14C, se puede observar la localización del

aminoácido más en detalle. La sustitución p.N263D introduce una carga negativa en un “bolsillo” hidrofílico que podría estar afectando a las interacciones con residuos de CYC1 (interacción proteína-proteína). Sin embargo, no parece muy evidente deducir que la mutación tiene que ser deletérea pues las interacciones con residuos de CYC1 no parecen muy estrechas en esta región. Además, hay descrita una mutación similar en un aminoácido cercano de CYTB, p.N260D (figura 14C), que no es deletérea (Fuku *et al.*, 2002).

Con objeto de seguir analizando la posible patogenicidad de la mutación, se llevó a cabo un análisis de PCR-RFLP en distintos tejidos del paciente P10, tales como músculo, fibroblastos y cíbridos transmitocondriales contruidos a partir de fibroblastos (figura 15A). Estos análisis mostraron que la variante m.15533A>G se encontraba en homocigosis en todos los tejidos analizados, así como en cinco clones independientes de cíbridos transmitocondriales procedentes del paciente P10. El análisis de PCR-RFLP se extendió a muestras de sangre procedentes de la familia del paciente (figura 15B). De igual manera, tanto la madre como la tía materna del paciente, clínicamente asintomáticas, resultaron homoplásmicas para la mutación.

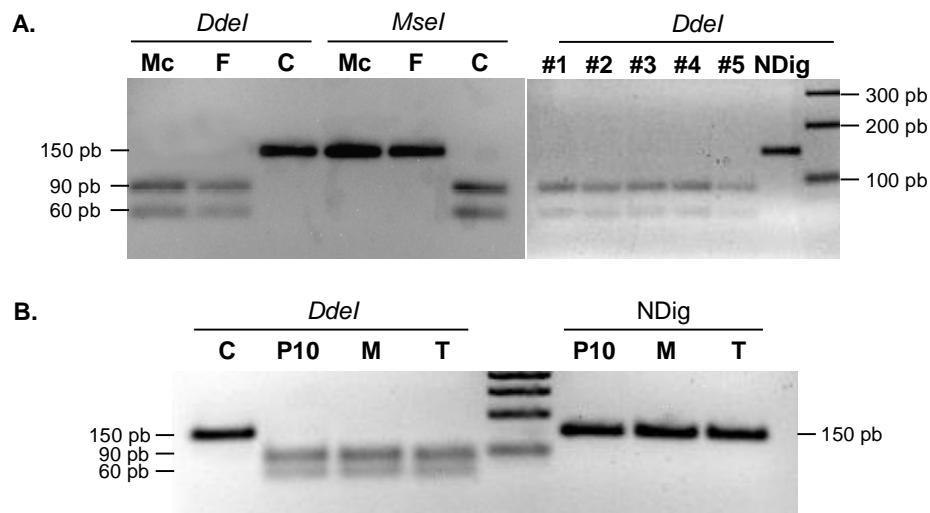


Figura 15. Análisis de PCR-RFLP del cambio nucleotídico m.15533A>G en el gen *CYTB*. **(A)** En músculo (Mc) y fibroblastos (F) del paciente P10 (panel izquierdo) y en 5 clones independientes de cíbridos (#1-5) procedentes de fibroblastos del paciente P10 (panel derecho). C, control. **(B)** En sangre procedente de la familia del paciente P10. C, control; M, madre; T, tía materna. NDig: ADN control sin cortar, que corresponde a un producto de PCR de 150 pb. La secuencia control contiene un sitio de restricción para la enzima *MseI* que después de la digestión resulta en dos productos de 90 y 60 pb. La secuencia mutada introduce un nuevo sitio de restricción para la enzima *DdeI* que después de la digestión resulta en dos productos de 90 y 60 pb.

1.1.1.2. Análisis bioquímicos en muestras del paciente P10

Las medidas de las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial mostraron un déficit aislado del complejo III en el músculo esquelético del paciente, y un déficit combinado

de los complejos III y IV en fibroblastos (tabla 2). Además, se pudo observar que la actividad enzimática de los complejos III y IV se restauraba en los cíbridos transmitocondriales, sobrepasando incluso los niveles control. El resto de actividades enzimáticas eran comparables a las actividades control. Estos resultados sugieren que las mutaciones implicadas en el déficit enzimático del complejo III del paciente P10 deben de ocurrir en genes nucleares, en lugar de genes codificados por el ADNmt.

Tabla 2. Actividades enzimáticas residuales de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en diferentes tejidos del paciente P10.

	Músculo*		Fibroblastos**		Cíbridos**	
	P10	Rango Control (n=100)	P10	Rango Control (n=9)	P10	Rango Control (n=4)
CI	17,1	10-30	35,1	26-50	9,8	4-17
CII	16,3	4,5-17,4	10	10-17	15,6	15-27
CI+CIII	14,5	8.5-26	122	223-750	48	46-96
CII+CIII	nd	-	2,7	4,4-18,5	3,1	2,6-7,3
CIII	14,6	28-98	15,1	29-87	64	13-38
CIV (COX)	22,7	16-80	15,2	49-128	40	20-33
CS	584	78-250	61	60-160	150	108-175

Las actividades enzimáticas se expresan en *U/cU citrato sintasa (CS) y **nmol.min⁻¹.mg prot⁻¹. La actividad de CS se expresa como mU/mg proteína. Los valores anormales se indican en negrita. nd, no determinado. Complejo I, CI; Complejo II (CII); Complejo III (CIII); Complejo IV (CIV, COX); P10: paciente 10.

1.1.1.3. Análisis de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial mediante electroforesis *blue native* en fibroblastos y cíbridos procedentes del paciente P10

Para determinar si los niveles estacionarios de los distintos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial estaban afectados en el paciente P10 se llevaron a cabo electroforesis en geles *blue-native* (BN-PAGE), a partir de mitocondrias aisladas con digitonina y dodecil maltosido (DDM) procedentes de fibroblastos y cíbridos transmitocondriales de dicho paciente.

Los análisis de *Western-blot* realizados con anticuerpos contra las subunidades Core 2 y COX II de los complejos III y IV, respectivamente, mostraron una marcada reducción en la cantidad de dichos complejos en fibroblastos. Los niveles de los demás complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en dicho tejido fueron comparables a aquellos observados en los controles (figura 16). Sin embargo, en cíbridos procedentes del paciente P10, los niveles de los complejos I, III y IV, así como los niveles del supercomplejo III₂+IV estaban muy aumentados respecto a los niveles control (figura 16), en consonancia con lo que ocurría con las actividades enzimáticas de

estos complejos (apartado 1.1.1.2, tabla 2). Se utilizó el complejo II como control de carga, ya que no presentaba alteraciones en su actividad enzimática entre las distintas muestras. Además, es el único complejo de la cadena respiratoria mitocondrial que no tiene ninguna subunidad codificada en el genoma mitocondrial y, por tanto, es menos susceptible a variaciones en una patología mitocondrial.

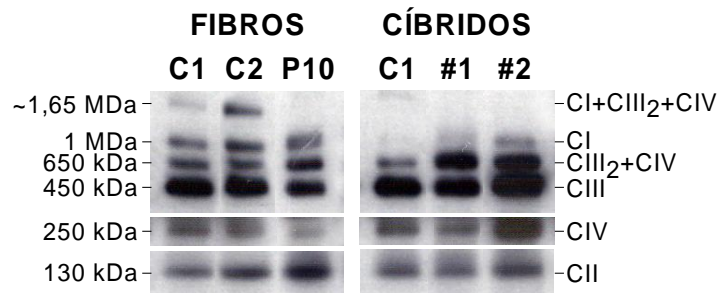


Figura 16. Análisis de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial mediante BN-PAGE, realizado con mitocondrias procedentes de fibroblastos y cíbridos transmitocondriales procedentes de controles y del paciente P10. La separación de los complejos multiproteicos fue analizada con 30 μ g de mitocondria aislada con digitonina en un gradiente del 4-15% de acrilamida/bisacrilamida. Para el análisis por *Western-blot*, se incubaron anticuerpos contra las siguientes subunidades OXPHOS: NDUFS3 (complejo I, CI); Core 2 (complejo III, CIII), COX II (complejo IV, CIV) y sdhA (complejo II, CII). Los supercomplejos III₂+IV (CIII₂+CIV) y I+III₂+IV (CI+CIII₂+CIV) se indican en la figura. C1 y C2, controles; P10, paciente 10 y #1-2, dos clones independientes de cíbridos transmitocondriales procedentes del paciente P10.

Todos estos resultados, junto con el hecho de que la mutación m.15533A>G se encuentre presente, tanto en la madre como en la tía materna del paciente en homoplasmia, siendo ambas asintomáticas, sugieren que la mutación m.15533A>G no es patogénica. Por este motivo, esta variante se ha considerado un polimorfismo “raro” y se ha incluido a este paciente en el grupo de pacientes sin causa genética conocida, que serán posteriormente analizados en el capítulo 3 de los resultados.

1.2. SECUENCIACIÓN DEL GEN *BCS1L*

Dentro de esta línea de trabajo, se planteó como siguiente objetivo la identificación de mutaciones en el gen *BCS1L* en aquellos pacientes con un déficit enzimático primario del complejo III mitocondrial, que no presentaban mutaciones en el gen *CYTB*. Para ello se llevó a cabo la secuenciación completa del gen *BCS1L*, en una serie de 20 pacientes.

1.2.1. Caracterización de las mutaciones encontradas en el gen *BCS1L*

A continuación se detalla la caracterización de las mutaciones halladas en los pacientes P4 y P6.

1.2.1.1. Análisis bioquímico y genético del paciente P4

Las medidas de las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial revelaron un déficit aislado del complejo III en el músculo del paciente, y un déficit combinado de los complejos III y IV en fibroblastos (tabla 3). Debido a la escasa muestra de músculo esquelético del paciente, la medida de la actividad del complejo I no pudo ser realizada en este tejido.

Tabla 3. Actividades enzimáticas residuales de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en diferentes tejidos del paciente P4.

Actividades enzimáticas de la cadena respiratoria	Músculo*		Fibroblastos**	
	Paciente P4	Rango Control (n=100)	Paciente P4	Rango Control (n=9)
Complejo I	nd	10-30	29.4	26-50
Complejo II	6.9	4.5-17.4	10	10-17
Complejos I+III	16.7	8.5-26.3	274	223-750
Complejos II+III	7,8	4,5-21	3,7	4,4-18,5
Complejo III	19.1	28-98	18.5	29-87
Complejo IV (COX)	26.2	16-80	44.1	49-128
Citrato sintasa (CS)	162	78-250	65	60-160

Las actividades enzimáticas están expresadas en *U/cU citrato sintasa (CS) y **nmol.min⁻¹.mg prot⁻¹. La actividad de CS es expresada como mU/mg proteína. Los valores anormales se indican en negrita. nd, no determinado.

1.2.1.1.1. Análisis de la secuencia genómica de *BCS1L* en el paciente P4

El análisis por secuenciación del ADNmt completo descartó la presencia de mutaciones patogénicas. La secuenciación de la región genómica completa de *BCS1L* en fibroblastos del paciente y el posterior análisis por PCR-RFLP, revelaron que el probando era heterocigoto compuesto de la mutación sin sentido c.166C>T (p.R56X), descrita previamente (De Meirleir *et al.*, 2003), así como de dos nuevas mutaciones en la región genómica 5' no codificante de *BCS1L*: g.1181A>G y g.1164C>G (secuencia de referencia en GenBank AF516670) (figura 17A).

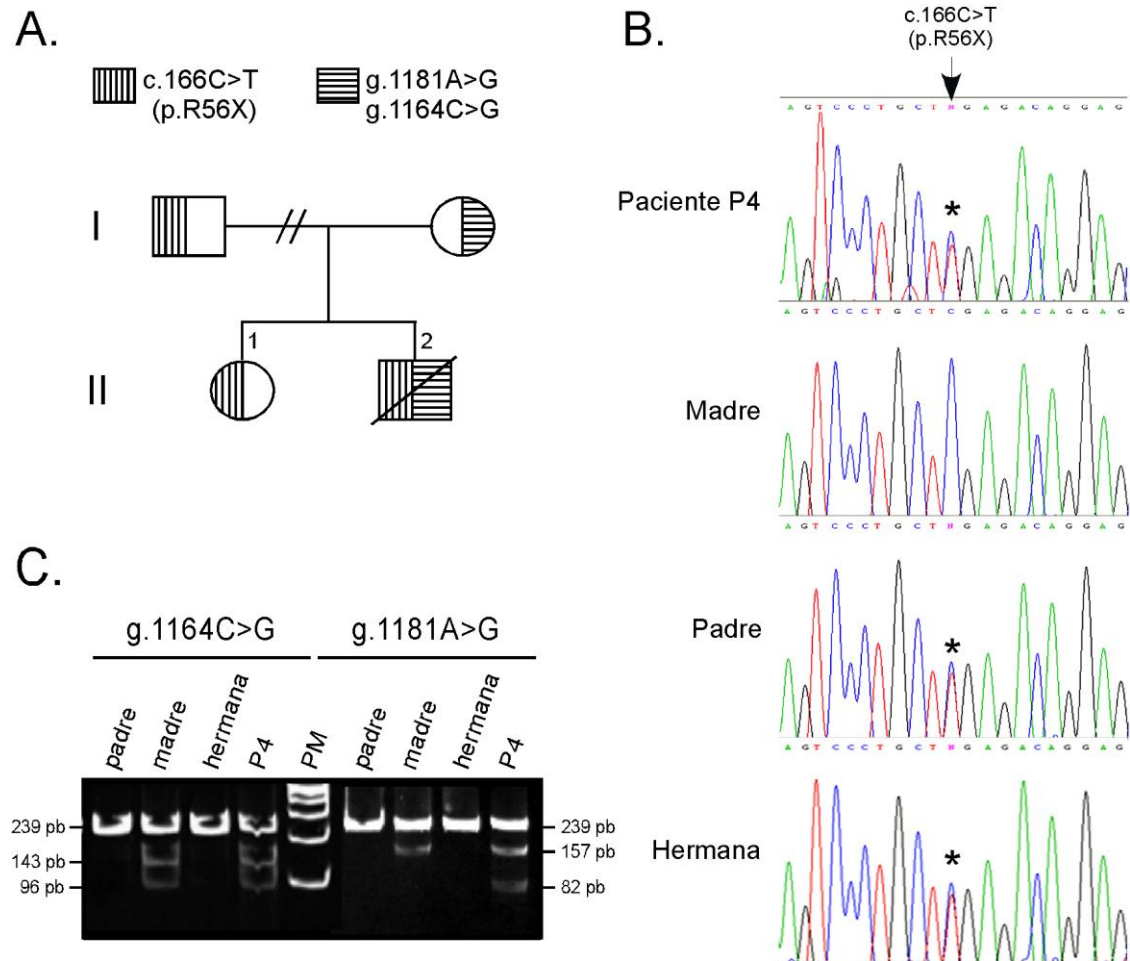


Figura 17. (A) Genealogía de la familia portadora de mutaciones en *BCSIL*. Se encontraron tres mutaciones heterocigotas en el gen *BCSIL*. El padre y la hermana mayor están sanos y son portadores de la mutación c.166C>T (p.R56X). Se identificaron, además, dos nuevas mutaciones, g.1181A>G y g.1164C>G, presentes en la madre sana. El paciente era portador de las tres mutaciones en heterocigosis, c.166C>T (p.R56X), g.1181A>G y g.1164C>G. **(B)** Electroferogramas que muestran la presencia de la mutación c.166C>T en ADN de sangre de la familia del paciente. El asterisco indica el nucleótido sustituido. **(C)** Análisis por PCR-RFLP de las mutaciones g.1181A>G y g.1164C>G. El ADN control (sin cortar) corresponde a la banda de 239 pb. La mutación g.1164C>G genera un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *NlaIV* y como resultado de la digestión se generan dos bandas de 143 pb y 96 pb. La mutación g.1181A>G crea un sitio de corte para la enzima de restricción *DraIII* y como resultado de la digestión se generan dos bandas de 157 pb y 82 pb. En la figura se muestra un marcador de peso molecular (PM) estándar.

Su padre y su hermana eran heterocigotos para la mutación c.166C>T (figura 17B), mientras que su madre sana era heterocigota para las mutaciones g.1181A>G y g.1164C>G (figura 17C). Mediante secuenciación directa en ADN procedente de sangre de la madre, se confirmó que ambas mutaciones estaban localizadas en el mismo alelo. Estas mutaciones no fueron detectadas en 400 alelos control de origen español.

1.2.1.1.2. Análisis de la secuencia del ADNc de *BCS1L* en el paciente P4

Las mutaciones g.1181A>G y g.1164C>G están situadas a una distancia de 840 y 857 nucleótidos por delante del codón ATG de inicio de la traducción, respectivamente. Estas posiciones -840 y -857 se encuentran en el segundo exón no codificante de *BCS1L*, que corresponde a la región 5' UTR de la variante larga del transcrito de *BCS1L* (Genbank NM_004328, figura 18A).

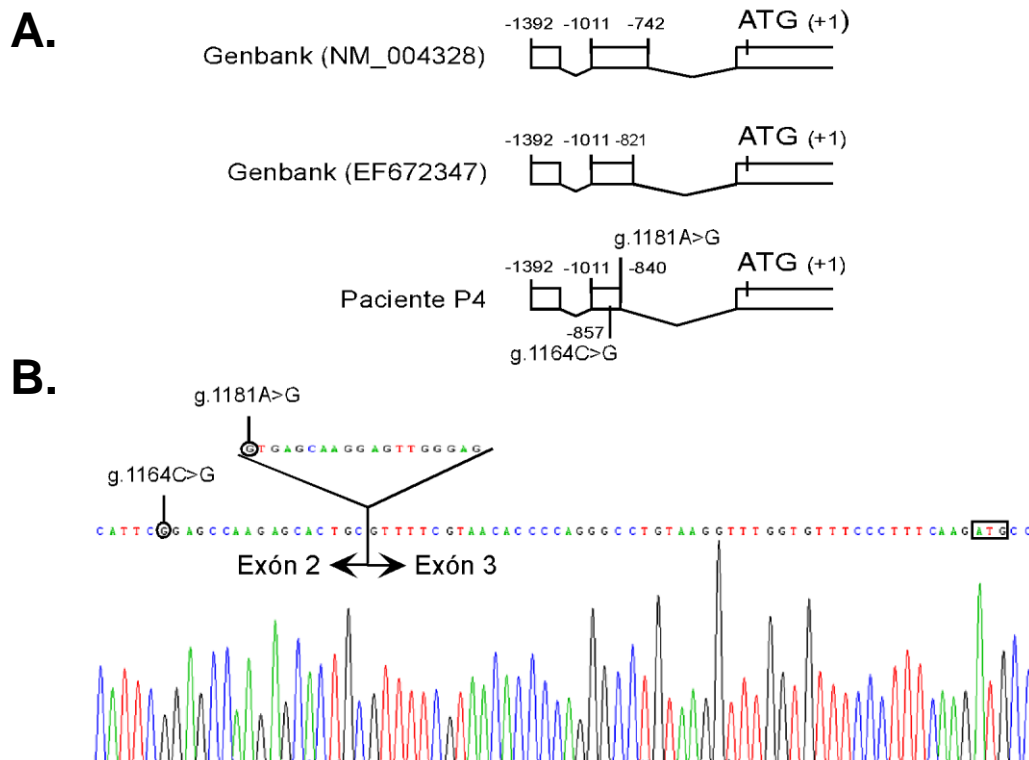


Figura 18. (A) Representación esquemática de las variantes del ARNm de *BCS1L* descritas en esta tesis. Las cajas blancas corresponden a regiones exónicas presentes en las secuencias de ARNm publicadas, las líneas indican regiones intrónicas. Las nuevas mutaciones encontradas en el la región 5' UTR del ARNm de *BCS1L* están indicadas en el paciente. La mutación g.1181A>G genera un nuevo sitio de *splicing* alternativo que produce una delección de 19 nucleótidos. La mutación g.1164C>G se encuentra ubicada 17 nucleótidos por delante de la mutación g.1181A>G en el 5' UTR. (B) Electroferograma que muestra un fragmento de la secuencia del ADNc de *BCS1L* de fibroblastos del paciente P4. Las mutaciones g.1181A>G y g.1164C>G están rodeadas con un círculo. La secuencia presente en la parte superior del electroferograma corresponde a la delección de 19 nucleótidos generada por la mutación g.1181A>G. La unión entre los exones 2 y 3 se indica con una flecha. El inicio de traducción ATG aparece recuadrado.

Se secuenció el ADNc completo de *BCS1L* en fibroblastos control y del paciente. En controles, el análisis genético de los fragmentos de ADNc de *BCS1L* amplificados reveló una secuencia de 5' UTR del ARNm de *BCS1L* no descrita previamente (número de acceso Genbank EF672347).

Dicha secuencia carece de los últimos 79 nucleótidos en el exón 2, respecto de la variante de Genbank NM_004328 (figura 18A). Esta variante apoya la existencia de diferentes especies de ARNm de *BCS1L* con la región 5' UTR procesada de forma alternativa, como se ha propuesto previamente (Petruzzella *et al.*, 1998; Visapää *et al.*, 2002).

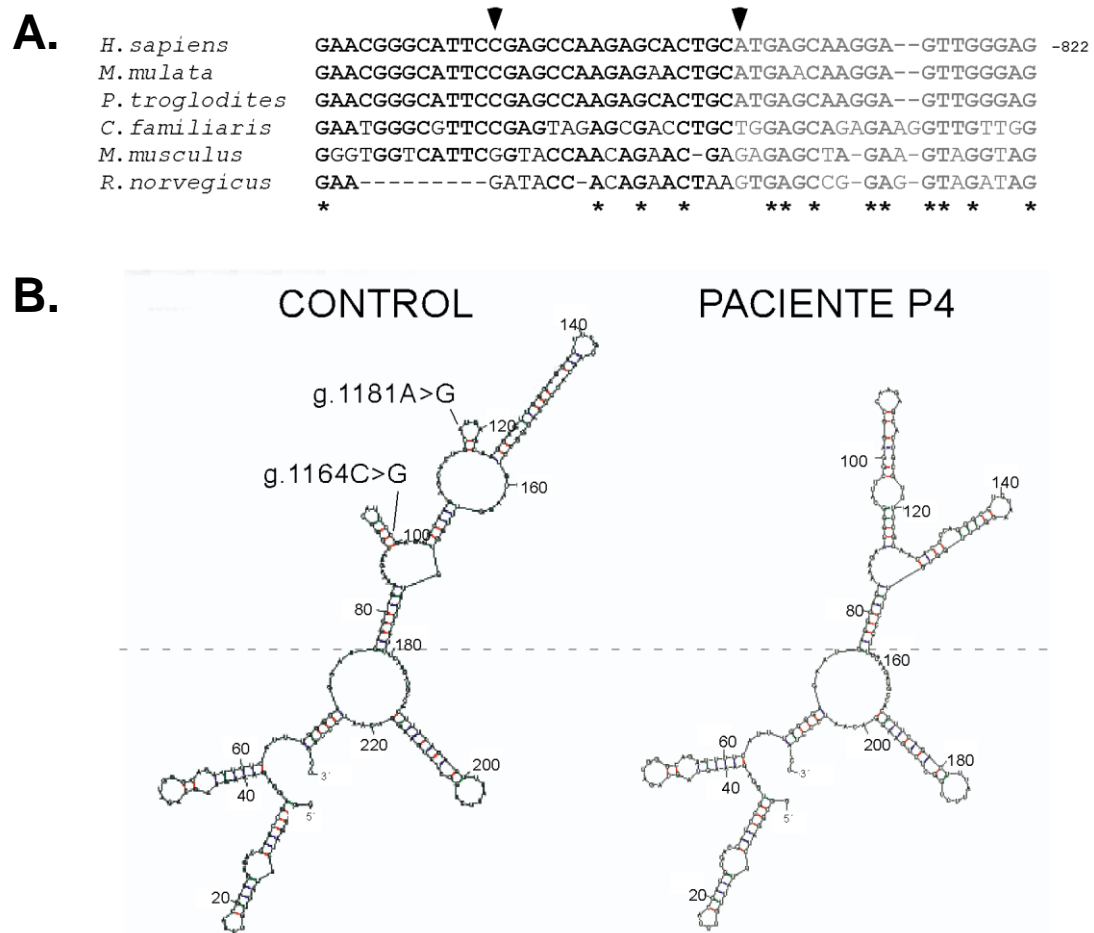


Figura 19. (A) Alineamiento evolutivo del ADNc de *BCSIL*. La secuencia abarca desde los nucleótidos -869 al -822 del gen *BCSIL* en humanos, y la correspondiente región homóloga en otras especies. Los sitios -857 y -840, mutados en el paciente, se indican con flechas. Los 19 nucleótidos delecionados se marcan en gris. Los nucleótidos conservados evolutivamente se marcan con un asterisco. **(B)** Modelo de predicción de los cambios estructurales causados por las nuevas mutaciones en la región 5' UTR del ARNm de *BCSIL*. La secuencia de Genbank EF672347 se utilizó como control en el programa mFOLD. La posición -857 formaría parte del tallo de un bucle de 11 nucleótidos que desaparecería en presencia de la mutación. La región de 19 nucleótidos delecionada, debido a la mutación g.1181A>G, formaría parte del tallo de un segundo bucle. La deleción de este fragmento en el paciente afectaría a la mayor parte de una cadena del tallo de ese bucle, liberando la otra cadena de manera que ésta se podría aparear con otra región diferente del ARNm. Este re-plegamiento del transcrito causaría importantes cambios estructurales en el 5' UTR.

En el paciente P4, la mutación heterocigota g.1181A>G genera un nuevo sitio de procesamiento alternativo que produce una delección de 19 nucleótidos en el 5' UTR del transcrito de *BCS1L*

(figura 18B). Dicha delección estaría localizada en la región no codificante, a 68 nucleótidos del codón ATG de inicio de la traducción del ARNm de *BCS1L* cuando se compara con la secuencia de referencia de Genbank EF672347 (figura 18A). La delección de 19 nucleótidos no estaba presente en al menos 300 secuencias control del ARNm de *BCS1L* de la base de datos de Genbank Expressed Sequence Tags (ESTdb) (Boguski *et al.*, 1993).

Las mutaciones g.1181A>G y g.1164C>G modifican residuos nucleotídicos que están muy conservados en primates, aunque variaciones significativas en la secuencia, incluyendo algunas delecciones, se pueden observar en roedores y laurasiaterios (figura 19A). Además, la región delecionada de 19 nucleótidos está muy conservada a lo largo de la evolución, sugiriendo que esta región tiene un papel funcional importante. En la figura 19B se muestra un modelo predictivo del efecto combinado que las dos nuevas mutaciones producirían sobre la estructura del 5' UTR del ARNm de *BCS1L*. Para este análisis se utilizó el programa de predicción estructural mFOLD (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>).

1.2.1.1.3. Cuantificación de los niveles del ARNm de *BCS1L* en el paciente P4

Para ver el efecto que estas mutaciones tenían sobre la expresión del ARNm de *BCS1L* en el paciente P4, se analizaron los transcritos de *BCS1L* mediante un ensayo de PCR a tiempo real. Los transcritos de *BCS1L* se midieron respecto a los transcritos de la β -actina, que se usó como control interno. Los resultados de la PCR mostraron que los niveles relativos de los transcritos de *BCS1L* en fibroblastos del paciente P4 estaban reducidos un 70% respecto del valor control (figura 20A), sugiriendo un defecto en la estabilidad de los ARNm de *BCS1L*. Para determinar la cantidad relativa de los transcritos de *BCS1L*, expresados en el paciente, que portaban la mutación heterocigota sin sentido c.166C>T (p.R56X), se realizó un análisis de PCR-RFLP en el ADNc amplificado a partir de fibroblastos del paciente P4 y de controles. El análisis cuantitativo de 3 geles/experimentos diferentes indicó que alrededor del 10-15% de los transcritos que se expresaban portaban la mutación sin sentido c.166C>T (p.R56X) (figura 20B). Por exclusión, se predice que el resto de transcritos del paciente (~85-90%) portaban las mutaciones g.1181A>G y g.1164C>G. Estos resultados demuestran la transcripción de las dos variantes del ARNm de *BCS1L* desde ambos alelos en el paciente. Se descartó la posible contaminación de las muestras de ADNc con ADN genómico (ADNg) después de realizar el mismo ensayo de PCR-RFLP a partir de ADNg del paciente (figura 20C).

1.2.1.2. Análisis bioquímico y genético del paciente P6

Los valores de las actividades enzimáticas de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en músculo esquelético del paciente P6, mostraron un déficit aislado del complejo

III (58% de actividad respecto del valor control más bajo). En fibroblastos se indentificó un déficit enzimático moderado del complejo III (93% de actividad respecto del valor control más bajo) (tablas 4 y 6).

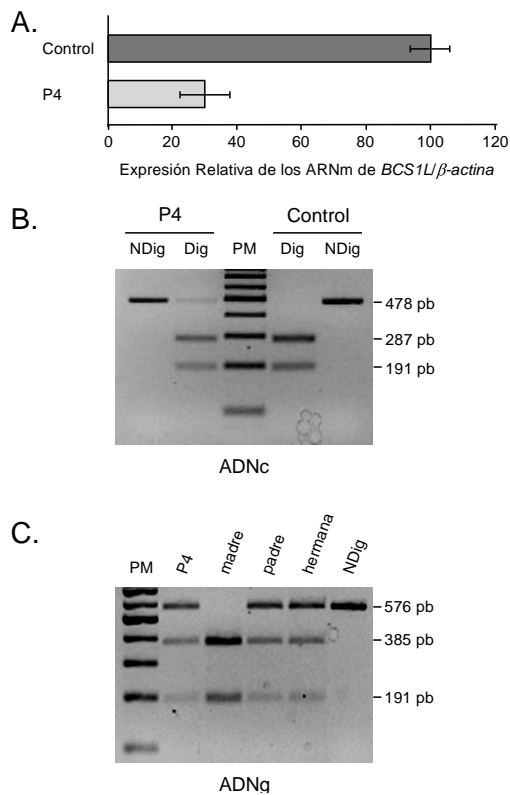


Figura 20. (A) Análisis de los niveles del ADNc de *BCS1L* en fibroblastos del paciente mediante PCR a tiempo real. Los niveles de transcritos de *BCS1L* se

determinaron con respecto a los niveles de transcritos de la β -actina, usado como referencia interna. (B) Análisis mediante PCR-RFLP de la mutación heterocigota c.166C>T (p.R56X) en el ADNc de *BCS1L* extraído de fibroblastos control y mutados. NDig: corresponde al producto de PCR sin digerir de 478 pb. La mutación c.166C>T (p.R56X) elimina un sitio de corte para la enzima de restricción *AvaI*. El fragmento amplificado del alelo control es digerido (Dig) en dos fragmentos de 287 y 191 pb, respectivamente. (C) Análisis mediante PCR-RFLP de la mutación heterocigota c.166C>T (p.R56X) en el ADNg de *BCS1L* extraído de sangre de los miembros de la familia del paciente. NDig: corresponde al producto de PCR sin digerir (ADN control) de 576 pb. La mutación c.166C>T (p.R56X) elimina un sitio de corte para la enzima de restricción *AvaI*. El fragmento amplificado del alelo control es digerido (Dig) en dos fragmentos de 385 y 191 pb, respectivamente. En las figuras se muestra un marcador de peso molecular (PM) estándar. Se utilizó el mismo par de oligonucleótidos para las dos reacciones (B) y (C). PM, peso molecular.

Tabla 4. Actividades enzimáticas residuales de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en diferentes tejidos del paciente P6.

Actividades enzimáticas de la cadena respiratoria	Músculo*		Fibroblastos**	
	Paciente P6	Rango Control (n=100)	Paciente P6	Rango Control (n=9)
Complejo I	11.9	10-30	27.1	26-50
Complejo II	8.5	4.5-17.4	11.2	10-17
Complejos I+III	7.8	8.5-26.3	211	223-750
Complejos II+III	2.3	4.5-21	17.6	4.4-18.5
Complejo III	16.2	28-98	27.1	29-87
Complejo IV (COX)	21.9	16-80	59.5	49-128
Citrato sintasa (CS)	208	78-250	105	60-160

Las actividades enzimáticas están expresadas en *U/cU citrato sintasa (CS) y **nmol.min⁻¹.mg prot⁻¹. La actividad de CS es expresada como mU/mg proteína. Los valores anormales se indican en negrita. nd, no determinado.

1.2.1.2.1. Análisis de la secuencia genómica de *BCS1L* en el paciente P6

El análisis del ADNmt descartó la presencia de las mutaciones patogénicas más frecuentes, así como de reorganizaciones genéticas o mutaciones en el gen *CYTB*. La secuenciación directa y el análisis mediante PCR-RFLP del gen *BCS1L* revelaron que el probando era homocigoto para la nueva mutación c.148A>G (figuras 21A y 21B). Dicha mutación estaba ausente en 400 alelos control de origen español y tampoco apareció en ninguna base de datos de polimorfismos (SNP). Los padres del probando eran heterocigotos para la mutación (figura 21B). La mutación causa una sustitución del aminoácido treonina por una alanina (p.T50A) en el primer exón codificante, que modifica un residuo aminoacídico muy conservado a lo largo de la evolución (figura 21C).

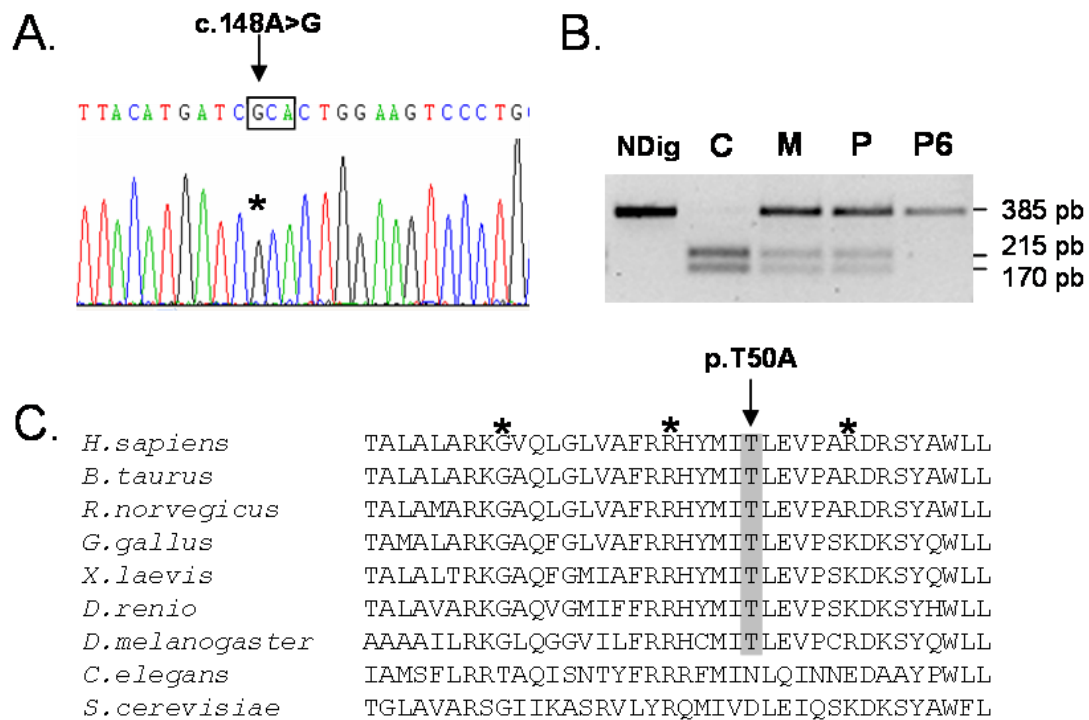


Figura 21. Análisis genético de la mutación c.148A>G. **(A)** Electroferograma que muestra el cambio de nucleótido en ADN de fibroblastos del paciente. La mutación se señala mediante un asterisco. **(B)** Análisis de PCR-RFLP de la mutación en *BCS1L*. NDig: el ADN control sin cortar produce un producto de PCR de 385 pb. La secuencia control contiene un sitio de restricción para la enzima *BclI* que después de la digestión resulta en dos productos de 215 y 170 pb. C, control; M, madre del paciente; P, padre del paciente y P6, el paciente P6. **(C)** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de *BCS1L* de distintas especies. Se resalta la treonina que ocupa la posición 50. Los asteriscos indican las posiciones de 3 mutaciones en *BCS1L* publicadas previamente.

1.2.1.2.2. Análisis de la expresión de BCS1L y de los complejos de la cadena respiratoria mediante electroforesis blue native en muestras biológicas del paciente P6

Se llevó a cabo electroforesis *blue native* para analizar el efecto que tenía la mutación sobre los niveles de expresión de BCS1L y del complejo III en mitocondrias aisladas de músculo y fibroblastos procedentes del paciente P6 (figura 22). En el músculo del paciente se observó una reducción marcada tanto del complejo de ~ 400 kDa que contiene BCS1L, como de los niveles del complejo III (~ 450 kDa) respecto al control. También se detectó una disminución, aunque más ligera, de los niveles de complejo III y del complejo BCS1L en los fibroblastos del paciente. Estos datos correlacionan con los resultados de la medida espectrofotométrica de la actividad enzimática del complejo III (tabla 4). Los niveles de expresión de otros complejos de la cadena respiratoria fueron normales (no se muestran). Se utilizó el anticuerpo de la subunidad *sdhA* del complejo II como control de carga. Un estudio más completo se llevó a cabo en fibroblastos del paciente P6, ver apartado 2.4.

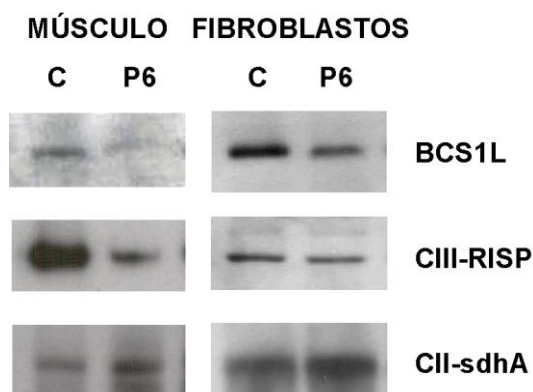


Figura 22. Niveles de BCS1L y del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial en distintos tejidos del paciente. Se analizaron 30 µg de proteína mitocondrial en un gel *blue native* de gradiente 4-15%. Se realizó el *Western-blot* usando los anticuerpos primarios indicados. C, control; P6, paciente P6.

DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO 1

Los déficits enzimáticos del sistema OXPHOS constituyen la primera causa de errores congénitos del metabolismo energético, siendo el déficit del complejo III mitocondrial un defecto relativamente común de dicho sistema. Este déficit se ha asociado con una amplia variedad de enfermedades multisistémicas, principalmente musculares y neurológicas (Borisov, 2002). Por ello, resulta interesante el estudio de las bases moleculares del déficit enzimático del complejo III humano, en patologías mitocondriales asociadas a fallos primarios en la actividad de dicho complejo. Uno de los objetivos de este trabajo se centró en la identificación de mutaciones que conducen a fallos en la biosíntesis del complejo III, generándose un déficit enzimático de dicho complejo y una disminución en la producción de energía. Inicialmente, realizamos una búsqueda de mutaciones en el gen *citocromo b* (*CYTB*) del ADNmt, pues las mutaciones en este gen constituían la causa más común de déficit del complejo III.

Posteriormente, ampliamos la búsqueda a mutaciones en el gen nuclear *BCSIL*, también asociadas con esta patología. En el desarrollo de esta búsqueda se identificó un nuevo polimorfismo, m.15533A>G, en el gen mitocondrial *CYTB*, así como tres nuevas mutaciones: g.1181A>G, g.1164C>G y c.148A>G, en el gen *BCSIL*.

1. POLIMORFISMO m.15533A>G EN EL GEN MITOCONDRIAL *CYTB*

Después de secuenciar el gen *CYTB* en 33 pacientes seleccionados por sus características clínicas y por la disminución de la actividad enzimática del complejo III en homogenado muscular, únicamente en el caso del paciente P10 se identificó una variante genética, m.15533A>G, no descrita previamente. Este paciente, un niño de 7 años con acidosis láctica congénita que cursó con ataques epilépticos y mioclonias al año de edad, presentó un déficit enzimático aislado del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial en músculo esquelético y un déficit combinado de los complejos III y IV en fibroblastos. El hecho de que no se hayan encontrado mutaciones patogénicas en dicho gen en los otros 32 pacientes analizados es interesante, puesto que las mutaciones en *CYTB* han sido descritas como las más frecuentes en las deficiencias aisladas de complejo III.

Existían varios hallazgos que hacían pensar que esta variante genética podía tratarse de una nueva mutación patogénica: i) el análisis completo del ADNmt, además de permitir determinar el haplogrupo del paciente P10 (haplogrupo H2), permitió descartar la presencia de otras mutaciones patogénicas ya descritas; ii) a pesar de que el paciente P10 era homoplásmico para el cambio nucleotídico m.15533A>G tanto en músculo como en fibroblastos, dicho cambio estaba ausente en 200 secuencias control de origen español y tampoco apareció en ninguna base de datos de polimorfismos (SNP); iii) el cambio m.15533A>G provoca una sustitución del aminoácido asparagina por un ácido aspártico (p.N263D), lo que introduciría una carga negativa en un “bolsillo” hidrofílico en el espacio intermembrana que podría estar afectando a las interacciones con residuos de la subunidad CYC1 (interacción proteína-proteína) y iv) la sustitución p.N263D modifica un residuo aminoacídico conservado en la mayoría de los mamíferos y presente en una región muy conservada en todas las especies analizadas.

Sin embargo, se encontraron otras evidencias que no apoyaban la patogenicidad de esta variante genética: i) el cambio nucleotídico m.15533A>G se encontraba presente tanto en la madre del paciente como en la tía materna de una manera homoplásmica siendo ambas clínicamente asintomáticas; ii) aunque la sustitución p.N263D podría estar afectando a las interacciones con residuos de CYC1, dichas interacciones no parecen muy estrechas ya que hay descrita una sustitución en *CYTB* muy cercana a la posición mutada en el paciente P10, p.N260D (figura 14C), que está descrita como no deletérea (Fuku *et al.*, 2002) y iii) la elaboración de cíbridos transmitocondriales confirmó el efecto del fondo nuclear sobre la variante genética

m.15533A>G. Se observó que en híbridos se sobreexpresaban, tanto los niveles de las actividades enzimáticas, como los niveles proteicos de los complejos III y IV de la cadena respiratoria respecto de los controles. Sin embargo, podría ser que este aumento de los niveles de los distintos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en híbridos, sea un mecanismo compensatorio que podría enmascarar un posible efecto de la mutación sobre la cinética de ensamblaje de los distintos complejos, como se ha visto anteriormente (Pello *et al.*, 2008). Para demostrar esta hipótesis se requieren experimentos adicionales.

El conjunto de estas observaciones apoyan que la mutación m.15533A>G no es patogénica o deletérea, sino que se debe considerar un polimorfismo “raro”. Nuestros datos sugieren, por tanto, que deben existir factores nucleares que están implicados en el déficit enzimático del complejo III en el paciente P10. Por este motivo se incluyó a este paciente en el grupo de estudio sin causa genética conocida, que se analizará más en profundidad en el capítulo 3 de la presente memoria.

2. MUTACIONES EN EL GEN *BCS1L*

Al inicio de este trabajo, la mayoría de las mutaciones asociadas al déficit enzimático del complejo III se habían descrito en el gen mitocondrial *CYTB*, con 27 mutaciones detectadas (Schägger *et al.*, 2004). Sin embargo, en los últimos años se han acumulado evidencias de que hay otros genes candidatos para dar lugar a este tipo de patologías y que, posiblemente, tengan la misma o mayor prevalencia que las mutaciones en el gen *CYTB*. Una prueba de ello es que en los últimos 2 años se han publicado más de la mitad de las mutaciones descritas en el gen *BCS1L*. Hasta la fecha, suman 25 mutaciones diferentes, contando las 3 nuevas mutaciones caracterizadas en esta tesis (de Lonlay *et al.*, 2001; De Meirleir *et al.*, 2003; Fernández-Vizarra *et al.*, 2007; Blázquez *et al.*, 2009; Gil-Borlado *et al.*, 2009) (figura 23). El hecho de que apenas se hayan encontrado mutaciones en los genes nucleares que dan lugar a las proteínas estructurales del complejo III, salvo en 2 casos aislados en los genes *UQCRB* y *UQCRCQ* (Haut *et al.*, 2003; Barel *et al.*, 2008), hace suponer que las mutaciones en este tipo de genes son deletéreas y no permiten la viabilidad de los individuos. Además, el hecho de que nuestro grupo haya detectado mutaciones en el gen *BCS1L* en 3 de 20 pacientes analizados y tan sólo 1 polimorfismo en el gen *CYTB* en 1 paciente de 33 analizados, sugiere que podría haber una mayor prevalencia de las mutaciones en *BCS1L*. Todo ello es indicativo de que, al igual que ocurre para el complejo IV o el complejo I (Fernández-Vizarra *et al.*, 2009; Lazarou *et al.*, 2009), en el caso de las patologías asociadas a un déficit del complejo III, también hay que volver la mirada hacia genes nucleares que codifican proteínas que ayudan al correcto procesamiento y ensamblaje de las distintas subunidades que forman el complejo, como es el caso del factor de ensamblaje *BCS1L*. Por este motivo, secuenciar el gen *BCS1L* en busca de la

mutación S78G podría ser usado como diagnóstico (incluso prenatal) en Finlandia, puesto que el síndrome de GRACILE, provocado por esta mutación, es de herencia fina con una prevalencia de 1:47.000. Para pacientes no fineses, la alternativa sería secuenciar el gen completo (Visapää *et al.*, 2002).

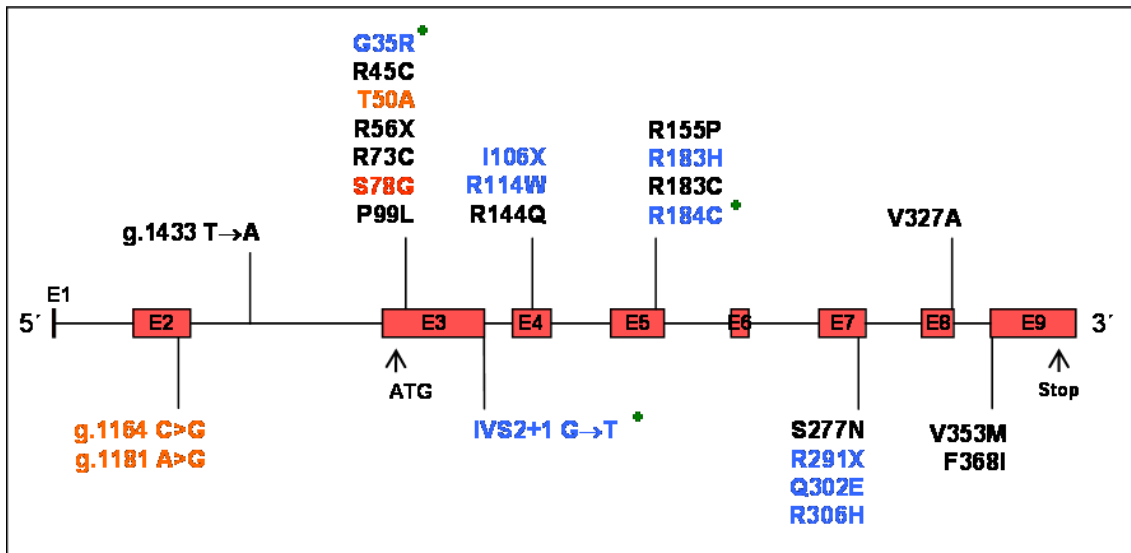


Figura 23. Mutaciones asociadas al gen *BCSIL*. En negro se muestran las mutaciones que dan lugar a un déficit enzimático del complejo III; en rojo, la mutación S78G que da lugar al Síndrome GRACILE (un acrónimo de los síntomas: retraso en el crecimiento, aminoaciduria, colestasis, sobrecarga de hierro y muerte temprana); y en azul se muestran las mutaciones asociadas al síndrome de Björnstad. Además, tres mutaciones que dan lugar al síndrome de Björnstad han sido asociadas con déficit del complejo III, estas mutaciones se han señalado con un asterisco. Las nuevas mutaciones descritas en esta tesis se muestran en naranja.

2.1. Patogenicidad de las mutaciones g.1181A>G y g.1164C>G en el gen *BCSIL*

El paciente P4 compartía un cuadro clínico parecido a otros pacientes con mutaciones en *BCSIL* (de Lonlay *et al.*, 2001; De Meirleir *et al.*, 2003; Fernández-Vizarra *et al.*, 2007; Blázquez *et al.*, 2009) (tabla 5). Este paciente, de origen español, cursó con acidosis metabólica neonatal, fallo en el crecimiento, fallo hepático, tubulopatía y déficit enzimático del complejo III en músculo y en fibroblastos, que más tarde desarrolló una hipotonía muscular ligera y microcefalia. El análisis molecular del gen *BCSIL* en el paciente reveló la presencia de 3 mutaciones heterocigotas: un cambio en el alelo paterno c.166C>T (p.R56X) previamente publicado, que presumiblemente conduce a una proteína truncada (De Meirleir *et al.*, 2003), y dos nuevas mutaciones en el alelo materno, g.1181A>G y g.1164C>G (Gil-Borlado *et al.*, 2009). Éstas fueron las únicas alteraciones genéticas encontradas en la región genómica completa de *BCSIL*, y dichas mutaciones no fueron halladas en 400 alelos control de origen español.

La presencia de las dos nuevas variantes genéticas en una región exónica no codificante del gen *BCSIL* sugería un problema a nivel post-transcripcional. Varias líneas de evidencia apoyan, al menos, el efecto deletéreo de la mutación g.1181A>G (no podemos aseverar con certeza que la mutación g.1164C>G tenga algún efecto): i) el análisis genético del ADNc de *BCSIL* reveló la presencia de la mutación g.1164C>G y de una delección de 19 nucleótidos en la región 5' UTR del ARNm de *BCSIL*. Esta delección fue generada por la mutación g.1181A>G que introduce un nuevo sitio de procesamiento alternativo; ii) no se encontró ninguna otra alteración genética en el ADNc de *BCSIL*; iii) la delección no estaba presente en los ADNc control testados, y tampoco estaba reflejada en las bases de datos de Genbank de secuencias diana expresadas (ESTdb); iv) la delección predecía cambios drásticos en la estructura secundaria del ARNm de *BCSIL* y; v) de acuerdo con esto, los análisis de cuantificación relativa de los transcritos de *BCSIL* mostraban una fuerte disminución en el paciente. Además, la delección de 19 nucleótidos era específica del ADNc amplificado a partir del alelo que contenía las mutaciones en el 5' UTR. Las dos especies de ARNm de *BCSIL* que transcriben ambos alelos se encontraban presentes en el paciente: una especie contenía la mutación c.166C>T (p.R56X) (aunque a niveles muy reducidos) y la más abundante contenía la mutación g.1164C>G junto con la delección de 19 nucleótidos. Nuestros resultados sugieren que la mutación c.166C>T, que introduce un codón parada en el aminoácido 56 de la proteína (p.R56X), puede resultar en un transcrito que es rápidamente degradado para evitar la síntesis de una proteína truncada. Esto podría ocurrir mediante el mecanismo de control de calidad conocido como *nonsense mediated decay* (NMD) (Culbertson, 1999), que asegura la fidelidad de la expresión del gen. Este mecanismo se habría inducido parcialmente en nuestro paciente, ya que aún se observan, aunque en una proporción bastante baja (10-15% de los transcritos expresados), transcritos que portan la mutación c.166C>T (p.R56X). Nuestros resultados sugieren que las nuevas mutaciones en el 5' UTR también contribuyen a la degradación de los transcritos de *BCSIL*.

Como dato interesante, se ha descrito previamente una mutación 588 nucleótidos por delante del codón ATG de inicio de traducción, en un niño británico con déficit del complejo III (Visapää *et al.*, 2002). Esta mutación también se localiza en la región 5' no codificante de *BCSIL* (figura 23, g.1433T>A). Aunque la posición -588 queda en principio localizada en un intrón de *BCSIL*, se puede pensar que esta posición podría formar parte de una región funcional de alguna variante alternativa de ARNm aún no caracterizada, lo que explicaría su posible efecto deletéreo. Aunque *BCSIL* parece estar ubicuamente expresada, se han observado diferencias de expresión específicas de tejido durante el desarrollo embrionario en ratón, lo que podría explicar las manifestaciones específicas de órgano de la enfermedad (Kotarsky *et al.*, 2007). Estas diferencias en los niveles de expresión de la proteína podrían estar reguladas por diferencias específicas de tejido en la expresión de los transcritos de *BCSIL* (Petruzzella *et al.*, 1998; Visapää *et al.*, 2002; Kotarsky *et al.*, 2007). Sería necesaria una caracterización precisa de las

variantes de ARNm de *BCSIL* específicas de tejido, para entender la heterogeneidad de las manifestaciones bioquímicas y clínicas de las mutaciones de *BCSIL*.

2.2. Patogenicidad de la mutación c.148A>G en el gen *BCSIL*

También se estudió un paciente (P6) que presentaba acidosis láctica persistente, hipotonía muscular, retraso psicomotor y de crecimiento, características dismórficas, sordera neurosensorial, hepatopatía ligera y déficit del complejo III (Blázquez *et al.*, 2009). Los análisis moleculares revelaron una nueva mutación en homocigosis c.148A>G en el gen *BCSIL*. El niño compartía algunas características clínicas descritas en otros pacientes con mutaciones en *BCSIL* y déficit del complejo III (de Lonlay *et al.*, 2001; De Meirleir *et al.*, 2003; Fernández-Vizarra *et al.*, 2007; Gil-Borlado *et al.*, 2009), excepto por inusual distribución anormal de la grasa subcutánea y la presencia de hipertriosis (tabla 5). El curso de la enfermedad no fue progresivo y el paciente P6 sobrevive a los 4 años de edad, con estabilización de los niveles de lactato y transaminasas en sangre, lo cual es una clara diferencia con el síndrome de GRACILE. Este paciente compartía la característica clínica de sordera neurosensorial, descrita en los casos de Síndrome de Björnstad, pero no presentaba alteraciones en la estructura del pelo, típica de este síndrome. En su totalidad, las características clínicas de este caso constituyen un fenotipo único no descrito previamente en pacientes con mutaciones en *BCSIL*.

Varias líneas de evidencia experimental apoyan el efecto deletéreo de la mutación c.148A>G: i) el análisis molecular reveló que era la única alteración genética en la región codificante de *BCSIL*; ii) los dos padres eran portadores heterocigotos de la mutación, que no se encontraba presente en 400 alelos control de origen español; iii) el déficit enzimático del paciente, más severo en músculo que en fibroblastos, correlacionaba con los niveles de la proteína BCS1L que eran más bajos en mitocondrias de músculo que en fibroblastos. Esta observación es coherente con estudios previos, en los cuales los niveles del complejo III completamente ensamblado en fibroblastos de pacientes portadores de mutaciones en *BCSIL*, eran prácticamente normales comparado con otros tejidos (de Lonlay *et al.*, 2001; Fernández-Vizarra *et al.*, 2007). Como se ha descrito previamente, la disminución en los niveles de la proteína BCS1L conduciría a una reducción en la incorporación de la proteína Rieske Fe-S en el complejo III, lo que se aprecia de forma consistente en el paciente P6. Este hecho conduciría a un ensamblaje defectuoso del complejo III y como consecuencia, una pérdida de la actividad enzimática del mismo (Fernández-Vizarra *et al.*, 2007; Hinson *et al.*, 2007). La mutación c.148A>G está localizada en el exón 3 de *BCSIL* (el primer exón codificante) y conduce a una sustitución del aminoácido treonina por alanina en la posición aminoacídica 50. Este aminoácido está altamente conservado en la evolución, lo que refleja su importancia funcional. La mutación se localiza en el dominio transmembrana, próximo al dominio de importe mitocondrial, que abarca los aminoácidos 69 al

Tabla 5. Presentaciones clínicas de las enfermedades asociadas a *BCSIL*

	Síndrome BJÖRNSTAD	Déficit del Complejo III	Síndrome GRACILE	Paciente P4	Paciente P6
Edad de inicio de los síntomas	Infancia	RN a 9 meses	RN	RN	RN
Edad de muerte	Vivo	< 4 años 4 pacientes vivos (≥ 4 años)	< 4 meses	11 meses	Vivo (4 años)
Acidosis láctica	-	++++	++++	si	si
Retraso en el crecimiento fetal	-	+++	++++	si	si
Hepatopatía	-	+++	++++	si	si
Tubulopatía	-	+++	++++	si	no
Fallo en el crecimiento	-	+++	++++	si	si
Hipotonía	-	+++	-	si	si
Encefalopatía	-	++	-	no	no
Retraso psicomotor	-	++	-	no	si
Hipoglucemia	-	+	-	si	no
Epilepsia	-	+	-	no	no
Microcefalia	-	+	-	si	si
Sordera neurosensorial	++++	+	-	no	si
<i>Pili torti</i>	++++	Un caso	-	no	no
Otros síntomas:					
Características dismórficas	-	Dos casos	-	no	si
Cabello quebradizo	-	Dos casos	-	no	no
Hipertriosis	-	Un caso	-	no	si
Mioglobinuria	-	Un caso	-	no	no
Ceguera	-	Un caso	-	no	no
Distribución anormal de la grasa subcutánea	-	Un caso	-	no	si
Datos de laboratorio:					
Sobrecarga de hierro	-	Dos casos	++++	no	no
Déficit enzimático del complejo III	n.d.	++++	-	si	si
Defecto de ensamblaje del complejo III	si	si	n.d.	si	si
RMN cerebral	Normal	Normal, Atrofia, Retraso en la mielinización, Síndrome de Leigh	Normal	Normal	Normal

Cada símbolo “+” se refiere a características clínicas publicadas en el ~25% de los pacientes. RN, recién nacido; RMN, resonancia magnética nuclear; n.d., no determinado.

83 (Petruzzella *et al.*, 1998; Fernández-Vizarra *et al.*, 2007). Esta región porta mutaciones asociadas previamente con los síndromes GRACILE y de Björnstad (Visapää *et al.*, 2002; Hinson *et al.*, 2007), (figura 21C) y sería un “punto caliente” o región diana para mutaciones que conducen a un déficit enzimático del complejo III (de Lonlay *et al.*, 2001; De Meirleir *et al.*, 2003; Fernández-Vizarra *et al.*, 2007).

2.3. Impacto de las mutaciones en el gen *BCS1L* sobre el fenotipo clínico

Se ha discutido mucho acerca del impacto que tienen las mutaciones en *BCS1L* y el amplio espectro clínico de enfermedades que produce (Fernández-Vizarra *et al.*, 2007; Fernández-Vizarra *et al.*, 2009; Hinson *et al.*, 2007; Blázquez *et al.*, 2009; Gil-Borlado *et al.*, 2009). Por ejemplo, la mutación S78G asociada al síndrome GRACILE es la más severa (el 50% de los pacientes mueren a los 12 días de edad y el otro 50% antes de los 4 meses), las mutaciones que provocan déficit enzimático del complejo III son relativamente menos graves, aunque la mayoría de los niños mueren entre 3 meses y los 5 años de edad, y las mutaciones que dan lugar a un síndrome de Björnstad son las menos deletéreas (vida media normal). Desde este punto de vista, el síndrome de GRACILE y el déficit del complejo III difieren sólo de manera sutil. Todavía permanece sin esclarecer por qué diferentes mutaciones en *BCS1L* producen tan amplio rango de fenotipos clínicos. Se ha propuesto que los defectos de *BCS1L* producen un fenotipo clínico “continuo” que dependería de la severidad de las distintas mutaciones. Estas mutaciones podrían estar afectando a varias funciones a la vez, ya que se ha especulado sobre un papel dual que tendría *BCS1L*, en la biogénesis mitocondrial y en la homeostasis del hierro (Visapää *et al.*, 2002; Fernández-Vizarra *et al.*, 2007). Según se ha demostrado anteriormente, la mutación S78G acelera la degradación de la proteína *BCS1L* *in vitro* (Visapää *et al.*, 2002). Se ha sugerido que si esta degradación ocurriese también *in vivo*, las cantidades reducidas de *BCS1L* en la mitocondria serían suficientes para ensamblar el complejo III pero comprometerían su función en el metabolismo del hierro. Esto explicaría por qué los pacientes que presentan síndrome de GRACILE no expresan un déficit enzimático del complejo III (Visapää *et al.*, 2002). Sin embargo, los pacientes P4 y P6 presentados en esta memoria, portaban mutaciones en *BCS1L* y tenían los niveles de la proteína *BCS1L* disminuidos, pero no presentaban sobrecarga de hierro y sí un déficit enzimático del complejo III de la cadena respiratoria. Además, los pacientes P1, P2 y P3 que portaban mutaciones en *BCS1L*, con niveles de *BCS1L* disminuidos, y que serán caracterizados a continuación en el capítulo 2 de resultados de la presente memoria, presentaban sobrecarga de hierro además de un déficit del complejo III, lo que sugiere mecanismos patogénicos más complejos. Por tanto, es relevante la búsqueda de mutaciones que provocan los defectos funcionales de *BCS1L*.

CAPÍTULO 2:

Caracterización de las consecuencias fisiopatológicas celulares de las mutaciones en el gen *BCS1L*

Por lo explicado en el capítulo 1, resulta de especial interés el estudio de los efectos sobre la fisiología celular, que pudieran provocar las mutaciones encontradas en el gen *BCS1L*. Se sabe que algunos defectos de ensamblaje de los distintos complejos que forman el sistema OXPHOS, pueden dar lugar a déficits enzimáticos de los mismos (Fernández-Vizarra *et al.*, 2009). Los defectos OXPHOS producen a su vez aumentos en la producción de radicales libres, que conllevan a cambios en la morfología de la red mitocondrial y a una activación de la apoptosis (Koopman *et al.*, 2005; Verkaart *et al.*, 2007; Koopman *et al.*, 2007; Suen *et al.*, 2008; Kwong *et al.*, 2007). Para nuestro siguiente estudio, se analizaron fibroblastos procedentes de 6 pacientes (P1-P6) que portaban mutaciones en el gen *BCS1L*. En dichos fibroblastos, se llevó a cabo una evaluación comparativa de las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial, y un análisis de la expresión de *BCS1L* y del ensamblaje de los diferentes complejos de la cadena respiratoria. Además, se llevaron a cabo estudios de *Western-blot*, de citometría de flujo y microscopía confocal para determinar los niveles de H₂O₂ y de las principales defensas enzimáticas antioxidantes de la célula, así como estudios de la disposición de la red mitocondrial y de localización intracelular de *BCS1L*. Por último, se realizó un ensayo del grado de apoptosis en dichos fibroblastos. La incorporación posterior de los pacientes P5 y P6 a estos estudios sólo ha permitido completar el desarrollo de algunos ensayos en los 6 pacientes.

2.1. ANÁLISIS GENÉTICO DE *BCS1L*

Se secuenció la región genómica completa de *BCS1L*, a partir de ADN de fibroblastos de 6 pacientes con sospecha de presentar mutaciones en este gen (tabla 6). Los fibroblastos de los pacientes P1, P2 y P3 fueron cedidos por la Dra. Sara Séneca (Bélgica) y el resto procedían de nuestro hospital. En el apartado de pacientes (páginas 50-54), se detallan los signos clínicos más significativos de los 6 pacientes en los que se han identificado mutaciones en *BCS1L*. El paciente P1, no descrito anteriormente, portaba la mutación c.296C>T (p.P99L) en homocigosis, cuya patogenicidad ha sido demostrada (de Lonlay *et al.*, 2001). Los pacientes P2 y P3, previamente descritos, portaban las mutaciones patogénicas c.133C>T (p.R45C) y c.166C>T (p.R56X) en heterocigosis (De Meirleir *et al.*, 2003). El paciente P4, descrito en el apartado 1.2.1.1 del capítulo 1 de resultados, era heterocigoto compuesto de la mutación c.166C>T (p.R56X), publicada previamente (De Meirleir *et al.*, 2003), y de dos nuevas mutaciones en la región genómica 5' no codificante de *BCS1L*: g.1181A>G y g.1164C>G (secuencia de referencia en GenBank AF516670). El paciente P5 era portador de la mutación R184C en el alelo paterno, descrita como patogénica previamente (Fernández-Vizarra *et al.*, 2007; Hinson *et al.*, 2007), pero no se identificaron posibles mutaciones patogénicas en el alelo materno salvo la variante nucleotídica g.1892A>G en homocigosis, no descrita anteriormente.

Esta variante, al igual que la variante g.1433T>A publicada previamente (Visapää *et al.*, 2002), está localizada en el interior de una región intrónica., por lo que es difícil explicar un posible efecto deletéreo. El paciente P6, descrito en el apartado 1.2.1.2 del capítulo 1 de resultados, portaba la mutación c.148A>G (p.T50A) en homocigosis. En la tabla 6 se resumen las mutaciones y los hallazgos más significativos de estos pacientes.

2.2. ANÁLISIS DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

Para llevar a cabo este estudio se contó con los fibroblastos de estos 6 pacientes descritos, que presentaban un déficit de la actividad enzimática del complejo III mitocondrial en músculo (tablas 3, 4 y 6) y que portaban mutaciones en distintas regiones de *BCS1L*. Dada la enorme variabilidad de fenotipos clínicos asociados a mutaciones en este gen, se llevó a cabo un estudio comparativo en los fibroblastos de dichos pacientes con el fin de encontrar una relación causa-efecto.

En primer lugar se realizó un análisis espectrofotométrico de las actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial en fibroblastos, con el fin de determinar si mantenían el déficit enzimático del complejo III en dicho tejido (tabla 6). Las actividades enzimáticas mostraron un déficit combinado de los complejos III y I en los pacientes P1 y P2, un déficit combinado de los complejos III y IV en el paciente P4 y un déficit aislado del complejo III en el paciente P6. La medida de la actividad enzimática en fibroblastos del paciente P3 fue analizada previamente (De Meirleir *et al.*, 2003). Este paciente mostró un déficit del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial, aunque no se pudo determinar si se trata de un déficit aislado o combinado, ya que la actividad del complejo I no fue medida (De Meirleir *et al.*, 2003). Sin embargo, los fibroblastos del paciente P5 no presentaron ningún déficit en las actividades enzimáticas de ninguno de los complejos de la cadena respiratoria. Este resultado puede ser indicativo de la limitación que supone realizar experimentos en este tipo de tejido, pues las patologías mitocondriales afectan principalmente a los tejidos más oxidativos, como músculo o cerebro y, por tanto, un defecto que afecta a estos tejidos no necesariamente tiene por qué manifestarse en fibroblastos. Sin embargo, la dificultad para obtener estos tejidos hace que los fibroblastos, aún mostrando efectos menos agresivos, sean un modelo de estudio interesante a la hora de realizar un diagnóstico y estudios moleculares (van den Heuvel *et al.*, 2004).

Paciente	P1	P2	P3	P4	P5	P6
Género	Mujer	Varón	Mujer	Varón	Mujer	Varón
Edad de inicio de síntomas	RN	RN	RN	RN	19 meses	8 meses
Edad de muerte	7 meses	3 meses	3 semanas	11 meses	Viva (2 años)	Vivo (4 años)
Mutación en <i>BCS1L</i>	p.P99L	p.R56X p.R45C	p.R56X p.R45C	p.R56X g.1181A>G, g.1164C>G	p.R184C ?	p.T50A
% Actividad enzimática CI	82 (fibroblastos)	92 (fibroblastos)	ND	normal	normal	normal
% Actividad enzimática CIII	ND (músculo)	límite (músculo)	ND (músculo)	68 (músculo)	86 (músculo)	58 (músculo)
% Actividad enzimática CIV	60 (fibroblastos)	61 (fibroblastos)	92 (fibroblastos)	64 (fibroblastos)	normal (fibroblastos)	93 (fibroblastos)
Defecto ensamblaje en fibros	límite (fibros)	normal	normal	90 (fibroblastos)	normal	normal
Defecto ensamblaje en fibros	CI+CIII+CIV	CI+CIII	CI+CIII	CIII+CIV	CI	no
Fenotipos clínicos:						
Acidosis láctica	+	+	+	+	leve	+
Tubulopatía (S. Fanconi)	+	+	-	+	-	-
Hepatopatía	+	+	+	+	+	+
Hipoglucemia	-	+	+	+	-	leve
Fallo crecimiento	+	severo	-	+	-	+
Encefalopatía	-	+	-	-	+	-
Hipomía	+	+	+	+	-	+
Epilepsia	+	-	-	-	+	-
Microcefalia	+	-	-	+	-	-
Otros síntomas	peritonitis	neonurio grueso, ptosis	neonurio grueso	raquitismo, anemia	tetraparesias péticas, pérdida progresiva de la conciencia, depresión leve del ADNmt, miopatía, hipertonia	distribución anormal de la grasa subcutánea, hipertricotosis, características dismórficas, sordera neurosensorial leve
RMN cerebral	ND	retardo en la mielinización	normal	normal	lesiones en sustancia blanca y grs	normal
Sobrecarga de Fe ²⁺	+	+	+	-	ND	-
Consanguinidad	+	-	-	-	-	-

Tabla 6. Características clínicas y bioquímicas más relevantes de los pacientes con mutaciones en el gen *BCS1L*. Las actividades enzimáticas fueron expresadas como porcentaje respecto del control más bajo (tablas 2, 3 y 4) (De Meirleir *et al.*, 2003). Complejo I (CI); complejo III (CIII); complejo IV (CIV); fibros, fibroblastos; RN, recién nacido; S., síndrome; ND, no determinado.

2.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE BCS1L Y DE LAS SUBUNIDADES DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MEDIANTE ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Para evaluar si las mutaciones en el gen *BCS1L* afectaban a la expresión de la propia proteína BCS1L, así como a las subunidades de los complejos OXPHOS que presentaban un déficit enzimático en estos pacientes, se realizó una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) con lisados totales procedentes de fibroblastos control y de los primeros 4 pacientes (P1-P4). Los análisis de *Western-blot* realizados con un anticuerpo contra la proteína BCS1L mostraron niveles de expresión de BCS1L similares en los fibroblastos control y en los de los pacientes (figura 24). Sin embargo, los niveles de la subunidad RISP del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial estaban reducidos en los 4 pacientes de acuerdo con la disminución en la actividad enzimática del complejo III en estos pacientes, mientras que los niveles de la subunidad Core 2 del complejo III no presentaban variaciones entre pacientes y controles. Los niveles del resto de subunidades analizadas de otros complejos de la cadena respiratoria, como la subunidad NDUFA9 del complejo I, la subunidad COX5A del complejo IV o la subunidad sdhA del complejo II no fueron diferentes de los encontrados en controles. Se utilizó un anticuerpo contra la proteína β -actina como control de carga.

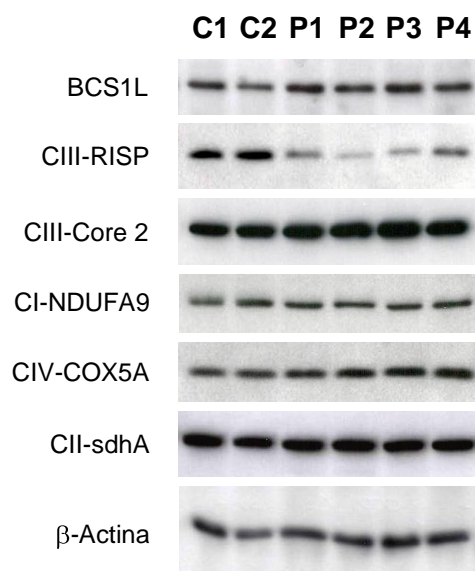


Figura 24. Análisis de las subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial mediante electroforesis SDS-PAGE realizado con 30 μ g de un lisado total procedente de fibroblastos de los pacientes portadores de mutaciones en *BCS1L*. Para el análisis por *Western-blot* se incubaron anticuerpos contra las siguientes subunidades OXPHOS: NDUFA9 (complejo I, CI), RISP y Core 2 del complejo III (CIII), COX5A del complejo IV (CIV) y sdhA (complejo II, CII). La señal obtenida con un anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína BCS1L se muestra en el panel superior. Se utilizó un anticuerpo contra la β -actina como control de carga.

2.4. ANÁLISIS DEL COMPLEJO BCS1L Y DE LOS COMPLEJOS DE LA CADENA RESPIRATORIA MEDIANTE ELECTROFORESIS BLUE NATIVE

A continuación, se quiso verificar en estos pacientes, si las mutaciones en el gen *BCS1L* afectaban a la expresión del complejo BCS1L, así como a la incorporación de la subunidad

hierro-azufre de Rieske (RISP) en el complejo III. Para ello, se realizaron electroforesis bidimensionales en geles de *blue-native* (BN-PAGE) a partir de mitocondrias extraídas con digitonina y dodecil maltosido (DDM) de fibroblastos control y de los 6 pacientes (P1-P6). En los geles de primera dimensión (1D), los análisis de *Western-blot* realizados con un anticuerpo contra la proteína BCS1L mostraron una disminución significativa en la cantidad del complejo BCS1L, de peso molecular ~400 kDa, en los fibroblastos de los pacientes P2, P3, P4 y P6. También se observó una reducción moderada de dicho complejo en el paciente P5, mientras que en el paciente P1 no hubo variaciones apreciables respecto a los fibroblastos control (figura 25, último panel). Asimismo, se pudo observar que en todos los pacientes aparecían una o dos señales de menor peso molecular aparente, de ~200 y ~100 kDa, los cuales estaban ausentes en controles. Estas señales podrían corresponder a intermediarios de ensamblaje o productos de degradación del complejo BCS1L, que se acumularían en presencia de BCS1L mutada.

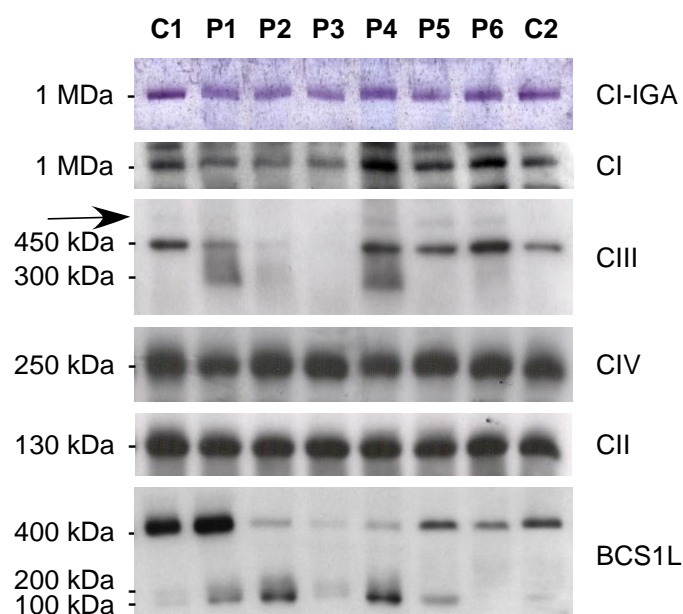


Figura 25. Análisis de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial mediante BN-PAGE realizado en fibroblastos de los pacientes portadores de mutaciones en *BCS1L*. La separación de los complejos multiproteicos fue analizada con 30 µg de mitocondria aislada en un gradiente del 4-15% de acrilamida/bisacrilamida. Estos geles se hicieron por duplicado para los ensayos de actividad en gel (IGAs) del complejo I (panel superior). Para el análisis por *Western-blot* se incubaron anticuerpos contra las siguientes subunidades OXPHOS: NDUFS3 (complejo I, CI), proteína hierro-azufre de Rieske (RISP) del complejo III (CIII), COX5A (complejo IV, CIV) y *sdhA* (complejo II, CII). La señal obtenida con un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína BCS1L se muestra en el panel inferior. La señal que corresponde al supercomplejo III₂+IV en el tercer panel se indica con una flecha (~650 kDa).

Asimismo, se utilizó un anticuerpo contra la proteína RISP del complejo III para ver los niveles de expresión del homodímero de complejo III de peso molecular ~450 kDa. Estos se hallaban claramente disminuidos en los pacientes P1, P2 y P3 (figura 25, tercer panel). Además, en los

pacientes P1 y P4 se observó que la subunidad RISP se acumulaba en un subcomplejo de ~300 kDa que estaba ausente tanto en las muestras control como en los demás pacientes, sugiriendo un defecto en la estabilidad o ensamblaje del complejo III. Este subcomplejo no colocalizaba con el complejo de BCS1L, como se ha demostrado previamente (Fernández-Vizarra *et al.*, 2009). Los niveles del complejo III fueron normales en los pacientes P5 y P6. Los niveles del complejo I de la cadena respiratoria también se encontraron disminuidos en los pacientes P1, P2 y P3, siendo normales en el resto de pacientes cuando se usó un anticuerpo contra la subunidad NDUFS3 de dicho complejo (figura 25, segundo panel). Además, el ensayo de actividad en gel (IGA) del complejo I mostró una disminución en la actividad enzimática en los pacientes P1, P2 y P3, lo que fue consistente con el análisis enzimático espectrofotométrico en fibroblastos (tabla 6). Los niveles de actividad enzimática del complejo I en el IGA del paciente P5 estaban ligeramente disminuidos, en este caso hubo correlación con una caída en los niveles de expresión del complejo I pero no con las actividades enzimáticas medidas espectrofotométricamente. Los niveles de expresión del complejo IV estaban ligeramente disminuidos en los pacientes P1 y P4 y fueron normales en el resto de pacientes cuando se usó un anticuerpo contra la subunidad COX5A del complejo IV (figura 25, cuarto panel). El análisis enzimático espectrofotométrico sólo mostró una disminución de la actividad enzimática del complejo IV en el paciente P4, mientras que dicha actividad se encontraba al límite del control más bajo en el paciente P1 (tabla 6). Estos datos indican que aunque existe un problema en el ensamblaje o estabilidad del complejo IV en el paciente P1, éste no afecta de forma severa a su funcionalidad o actividad. Finalmente, se utilizó un anticuerpo contra la subunidad sdhA del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial como control de carga, cuya expresión era similar entre pacientes y controles.

En los geles de segunda dimensión (2D), los análisis de *Western-blot* realizados con un anticuerpo policlonal contra la proteína BCS1L mostraron una reducción en la cantidad del complejo BCS1L de ~400 kDa (BCS1Lc) en los fibroblastos de todos los pacientes (figura 26). Como se observó en la 1D, en todos los pacientes aparecían una o dos señales de menor peso molecular aparente, de ~200 y ~100 kDa, respectivamente, a los que se les denominó BCS1L' los cuales estaban ausentes en controles. También, se utilizó un anticuerpo contra la proteína RISP del complejo III para cuantificar los niveles de dicho complejo; éstos estaban disminuidos en los pacientes P1, P2, P3 y P4. Además, la señal que corresponde al subcomplejo de ~300 kDa del complejo III se encontró aumentada en el paciente P4 al igual que en la electroforesis 1D, mientras que no se encontró aumentada en el paciente P1. Además, la señal que corresponde al supercomplejo III₂+IV también estaba disminuida en los pacientes P1, P2 y P3 (figura 26). Cuando se utilizó un anticuerpo específico contra la subunidad NDUFS3, los niveles de expresión del complejo I de la cadena respiratoria estaban disminuidos en los pacientes P1, P2 y P3 y eran normales en el resto de pacientes. Sin embargo, al utilizar un

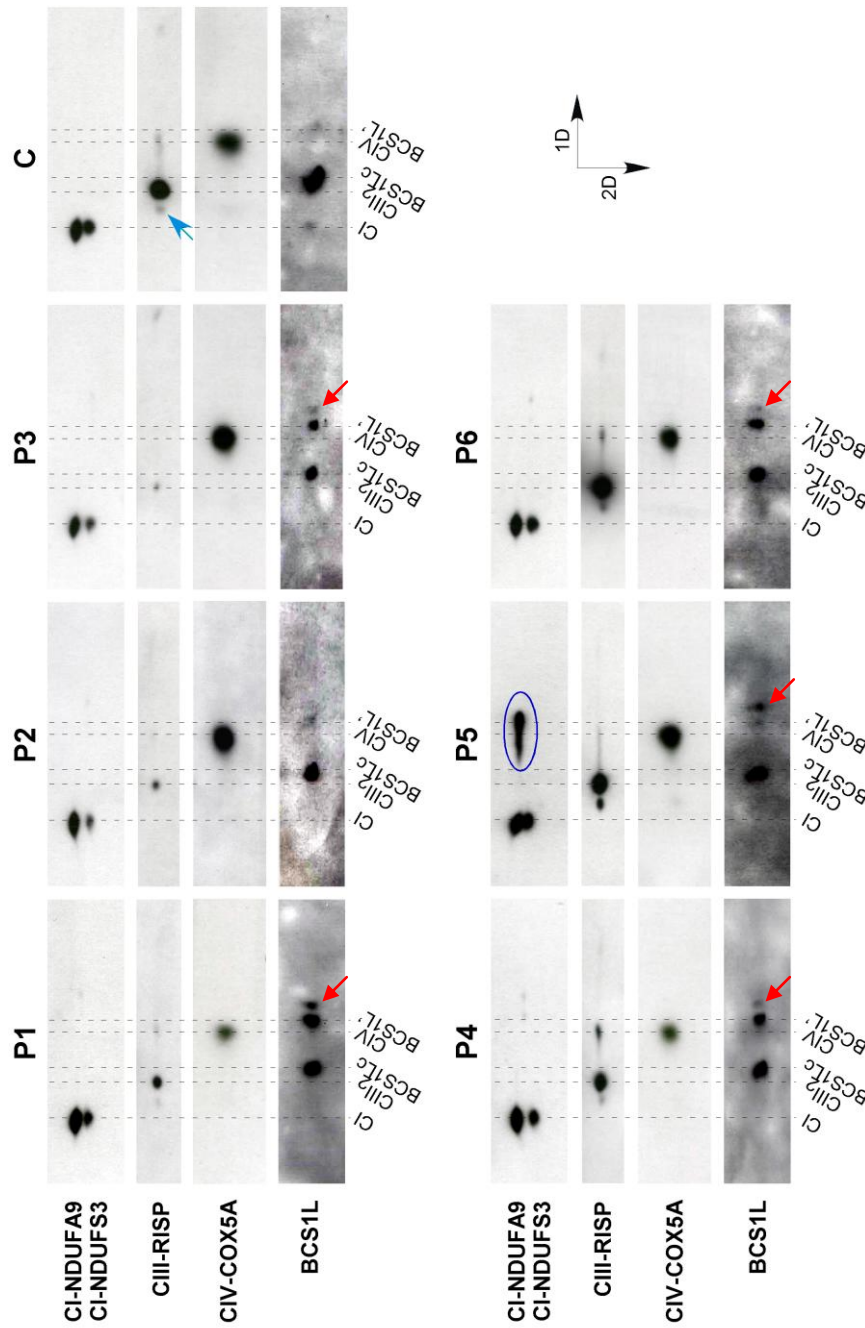


Figura 26. Análisis de distintas subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial mediante 2D-BN/SDS-PAGE realizado en mitocondrias procedentes de fibroblastos de los pacientes portadores de mutaciones en *BCS1L*. Para el análisis por *Western-blot* se incubaron anticuerpos contra las siguientes subunidades OXPHOS: NDUFS3 y NDUFA9 (complejo I, CI), proteína hierro-azufre de Rieske (RISP) del complejo III (CIII), COX5A (complejo IV, CIV). La señal obtenida con un anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína BCS1L, que se muestra en los paneles inferiores, se indica como BCS1Lc (complejo BCS1L, ~400 kDa) y como BCS1L' (complejo BCS1L, ~200 kDa). En los pacientes además aparece una tercera señal de BCS1L (~100 kDa) que se indica con una flecha roja. La señal que corresponde al supercomplejo III₂+IV se indica con una flecha azul en el control. La señal que corresponde a un defecto en la estabilidad o ensamblaje del CI en el paciente P5 se indica con un círculo azul.

anticuerpo contra la subunidad NDUF9, los niveles de complejo I aparecían normales en todos los pacientes, excepto en el paciente P5. Este paciente presentaba un patrón de degradación, no presente en los controles ni en ningún otro paciente, indicando un problema en la estabilidad o ensamblaje de dicho complejo (figura 26). Esto explicaría la ligera disminución de los niveles de actividad enzimática observados en este paciente en el ensayo IGA para el complejo I (figura 25, primer panel). Los niveles de la subunidad COX5A del complejo IV estaban ligeramente disminuidos en los pacientes P1 y P4 (figura 26) y eran normales en el resto de pacientes.

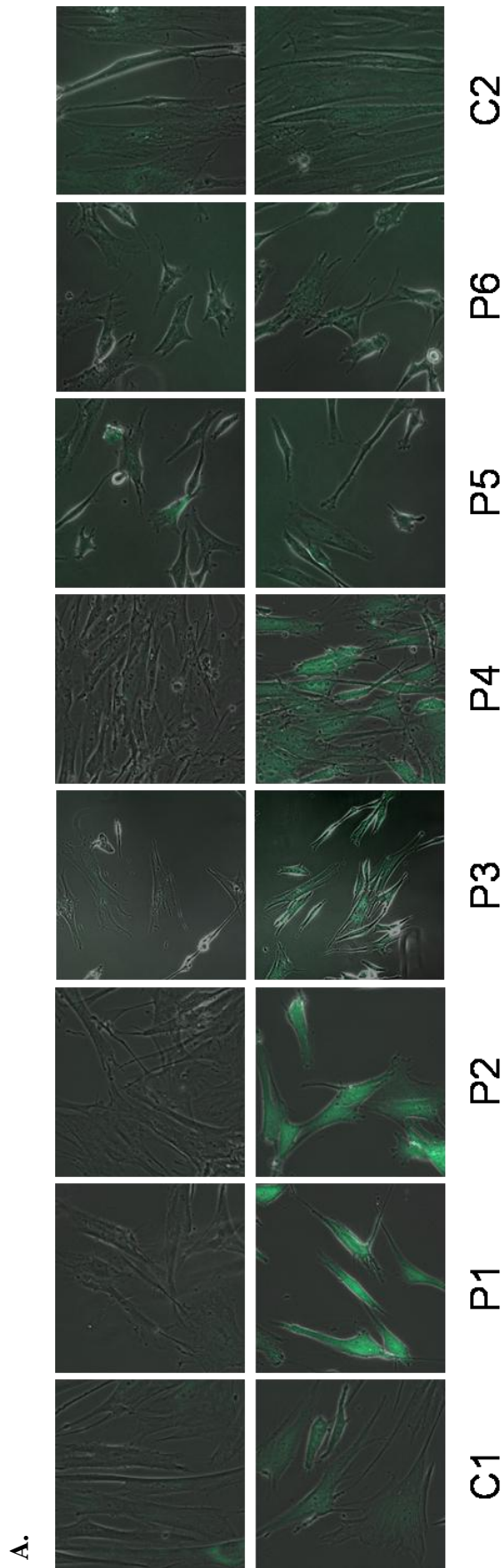
Estos resultados demuestran que todos los pacientes presentan una notable reducción en el complejo BCS1L, que va acompañada de una acumulación de dos subcomplejos de menor peso molecular. Además, los pacientes P1, P2 y P3 presentaron un déficit enzimático combinado de los complejos I y III en fibroblastos, que correlaciona con los defectos observados en el ensamblaje o estabilidad de dichos complejos. Asimismo, el paciente P1 presenta un defecto de estabilidad o ensamblaje del complejo IV, que no se ve reflejado en las medidas de actividad enzimática mediante espectrofotometría, sugiriendo que el defecto de ensamblaje no afecta a la funcionalidad del complejo. Por otro lado, el paciente P4 presenta un defecto de ensamblaje combinado de los complejos III y IV en fibroblastos, que es consistente con las medidas de actividad enzimática en estas células. El paciente P5 presenta un fallo de ensamblaje o estabilidad en el complejo I, lo que correlaciona con el ensayo IGA del complejo I, pero no con la medida espectrofotométrica de la actividad enzimática del complejo I. El paciente P6, con déficit en la actividad enzimática del complejo III, no presentó defectos de estabilidad o ensamblaje de ninguno de los complejos de la cadena respiratoria.

2.5. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE H₂O₂ Y DE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Se ha sugerido que en pacientes con mutaciones en *BCS1L*, la alteración mitocondrial cursaría con un desequilibrio en la cascada de reacciones de oxido-reducción de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que conllevaría una disminución de la producción de moléculas de ATP y un acúmulo de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hinson *et al.*, 2007). Por ello, se decidió analizar los niveles de H₂O₂, así como los niveles de las defensas antioxidantes naturales de la célula en los fibroblastos de los pacientes portadores de mutaciones en *BCS1L*.

2.5.1. Niveles de H₂O₂ en células vivas

En primer lugar se determinaron los niveles de H₂O₂, para lo que se llevaron a cabo experimentos de microscopía confocal y de citometría de flujo (figura 27) en células vivas



B.

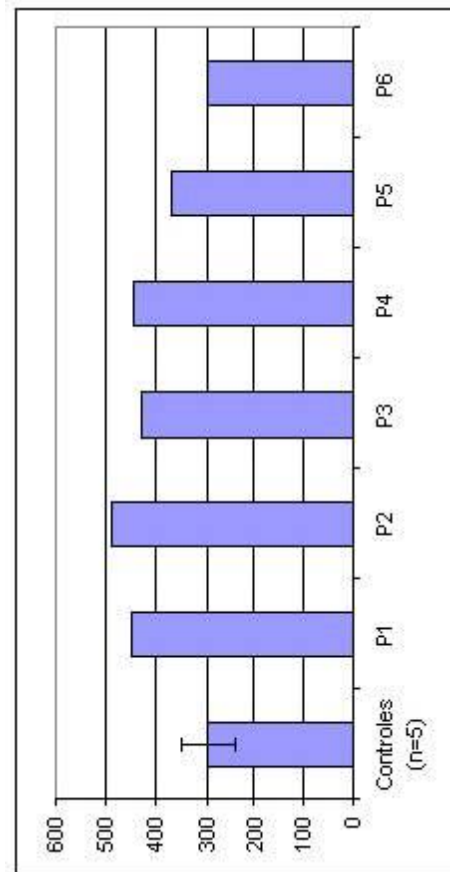


Figura 27. A. Imágenes de microscopía confocal de los niveles de H_2O_2 intracelulares en fibroblastos control y de pacientes portadores de mutaciones en *BCSL1*. Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos y fueron teñidas a 37°C con DCFDA (fluorescencia verde) para la detección de H_2O_2 . Las imágenes fusionadas muestran la fluorescencia y la luz transmitida. Los paneles superiores muestran niveles basales de autofluorescencia y los paneles inferiores fibroblastos cultivados con DCFDA. **B.** La gráfica muestra los niveles de H_2O_2 intracelulares medidos mediante citometría de flujo. Las células fueron cultivadas durante 30 minutos a 37°C en oscuridad con DCFDA, excitadas a 488 nm por un láser 15 mW y la fluorescencia emitida se midió con un FacScan.

incubadas con DCFDA, procedentes de fibroblastos control y de los 6 pacientes portadores de mutaciones en *BCS1L*. En los experimentos de microscopía confocal (figura 27A) se pudo observar que los niveles de H_2O_2 estaban aumentados en los pacientes P1, P2, P3 y P4, mientras que en los pacientes P5 y P6 eran similares a los fibroblastos control. En los experimentos de citometría de flujo se encontraron niveles de H_2O_2 muy aumentados en los 4 primeros pacientes (P1-P4) y levemente aumentados en el paciente P5, mientras que los niveles del paciente P6 eran comparables a los fibroblastos control (figura 27B). Las discrepancias en los resultados obtenidos en el paciente P5 entre los experimentos de microscopía y citometría, se pueden explicar en cierta medida por la mayor sensibilidad de la técnica de citometría, lo que permitió detectar más H_2O_2 en este paciente.

2.5.2. Niveles de las defensas antioxidantes

A continuación, se estudiaron los niveles de los principales sistemas enzimáticos de defensa antioxidante. Para ello, se obtuvieron lisados totales de fibroblastos control y de los pacientes P1-P4, que se sometieron a electroforesis SDS-PAGE seguida de *Western-blot* de las proteínas superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2 o Mn-SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPx). Las señales obtenidas se cuantificaron y se normalizaron con el control de carga β -actina. Como se puede ver en la figura 28, los niveles de Mn-SOD estaban disminuidos en los 4 pacientes respecto de los controles. Por el contrario, los niveles de catalasa estaban aumentados en todos los pacientes. De la misma manera, los niveles de GPx estaban aumentados en los pacientes P2, P3 y P4, aunque ligeramente disminuidos en el paciente P1.

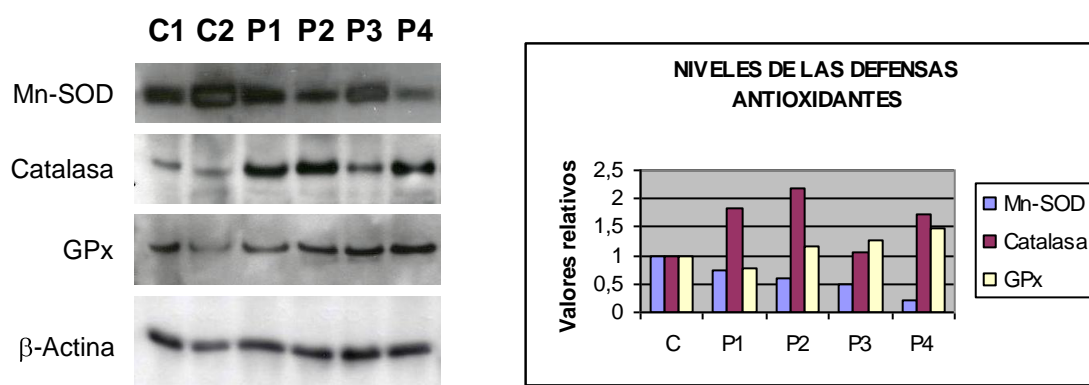


Figura 28. Análisis de los niveles de expresión de las defensas celulares contra la producción de radicales libres mediante electroforesis SDS-PAGE. Para el análisis por *Western-blot*, realizado con 30 μ g de un lisado total, se incubaron anticuerpos contra las proteínas Mn-SOD (SOD2 o superóxido dismutasa mitocondrial), catalasa y glutatión peroxidasa (GPx). Se utilizó un anticuerpo contra la proteína β actina como control de carga. A la derecha, se muestra una gráfica con los niveles relativos de las defensas antioxidantes frente a la señal de la β -actina. Las cuantificaciones fueron realizadas con el programa Image J.

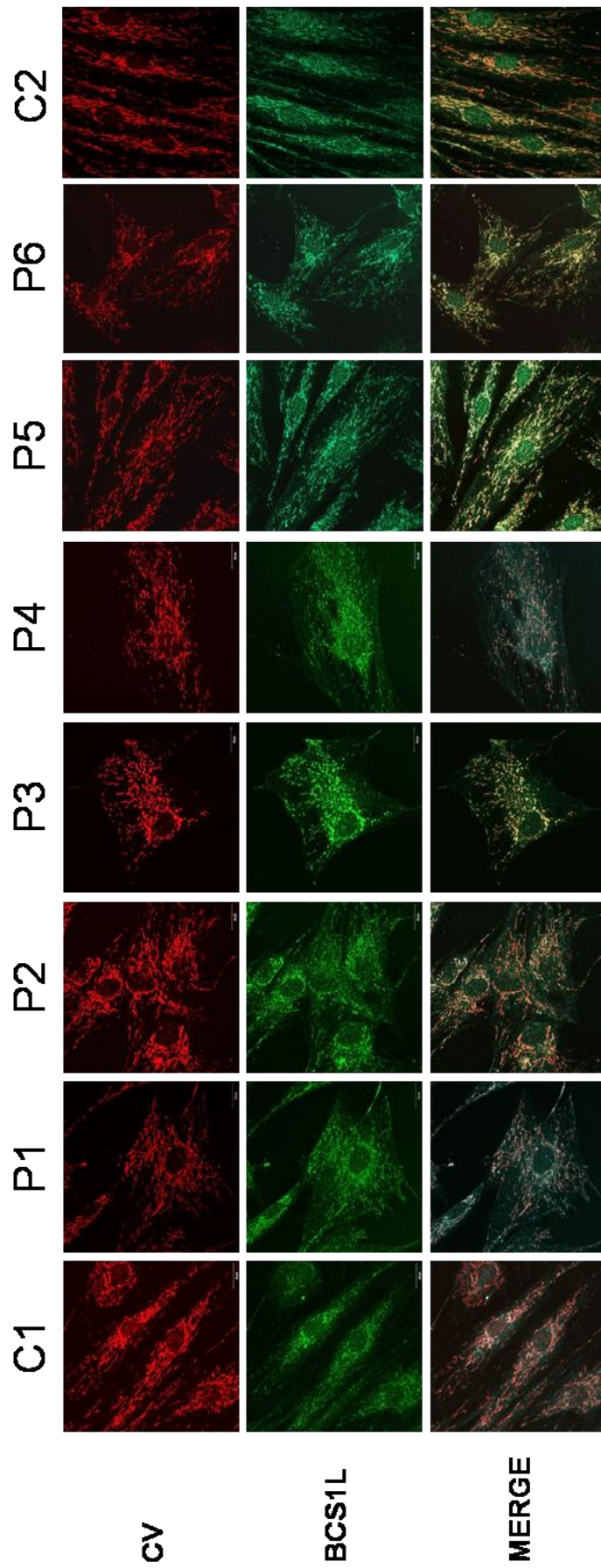


Figura 29. Imágenes de microscopía confocal que muestran la disposición de la red mitocondrial y la localización de BCS1L en fibroblastos control y en pacientes portadores de mutaciones en *BCS1L*. Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos y se les realizó una inmunofluorescencia doble contra la subunidad α del complejo V (CV) mitocondrial (fluorescencia roja), con el que se marca toda la red mitocondrial y contra BCS1L (fluorescencia verde). Las imágenes fusionadas (MERGE) muestran la localización de BCS1L en la mitocondria.

2.6. ANÁLISIS DE LA DISPOSICIÓN DE LA RED MITOCONDRIAL Y DE LA LOCALIZACIÓN DE BCS1L

Como se mencionó en la introducción de la presente memoria, las mitocondrias no se encuentran aisladas en la célula, sino que se hallan formando redes filamentosas alrededor del núcleo y a lo largo de la célula, e interaccionan entre sí mediante un proceso dinámico que implica eventos continuos de fusión y fisión mitocondrial (Legros *et al.*, 2002; Chan, 2006; Guillery *et al.*, 2008). La mayoría de las patologías mitocondriales van acompañadas, además de por un déficit de la actividad enzimática de uno o más complejos de la cadena respiratoria mitocondrial y un aumento en los niveles de ROS, por alteraciones en la morfología mitocondrial (Cerveny *et al.*, 2007; de Brito y Scorrano, 2008). Dados estos antecedentes, se estudió si las mutaciones en *BCS1L*, además de provocar un aumento en los niveles de H_2O_2 , provocaban alteraciones en la red mitocondrial. Para ello se realizaron estudios de microscopía confocal mediante inmunofluorescencia contra la subunidad α del complejo V del sistema OXPHOS (fluorescencia roja), con el que se marca toda la red mitocondrial (figura 29, panel superior). Esto permitió observar que la red mitocondrial de los cuatro primeros pacientes presentaba claras alteraciones. En estos fibroblastos, la red mitocondrial se encontraba parcialmente fragmentada, más notoriamente en los pacientes P3 y P4. Sin embargo, no había alteraciones apreciables en la morfología de la red mitocondrial de los pacientes P5 y P6, respecto a los controles.

Por otro lado, se analizó la localización intracelular de la proteína BCS1L, llevando a cabo una doble inmunofluorescencia contra la proteína BCS1L (fluorescencia verde) en el experimento de microscopía confocal (figura 29, panel inferior). Se observó que dicha señal de fluorescencia colocalizaba con la señal de fluorescencia roja, que marca la red mitocondrial, tanto en pacientes como en controles. Se puede apreciar, además, una señal verde en el exterior de las mitocondrias, en el citoplasma y en el núcleo, lo que podría indicar que BCS1L puede localizarse en otros compartimentos celulares desempeñando otras funciones. Sin embargo, no podemos descartar que esa señal verde extramitocondrial pueda ser un artefacto del experimento.

2.7. ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA

Por último, se procedió a analizar los niveles y mecanismos de muerte celular en fibroblastos procedentes de pacientes portadores de mutaciones en *BCS1L*. Para ello se llevó a cabo un ensayo de muerte celular en los cuatro primeros pacientes (P1-P4), mediante un ensayo que mide los niveles de histonas y ADN fragmentado (ver métodos, apartado 3.21).

Los resultados de dicho ensayo aparecen recogidos en una gráfica (figura 30A) que muestra que los niveles de apoptosis se encuentran aumentados en los pacientes P1, P2 y P3, mientras que en el paciente P4 están por debajo de la media de los controles. Queda pendiente realizar este ensayo en fibroblastos de los pacientes P5 y P6. De forma adicional, se realizó electroforesis de SDS-PAGE con un lisado total procedente de fibroblastos control y de los pacientes P1-P4 (figura 30B). Se realizó *Western-blot* contra la proteína caspasa 3, que se activa proteolíticamente induciendo apoptosis, y contra la proteína β -actina como control de carga. En este experimento se observó la activación de la proteína caspasa 3 en los pacientes P1 y P2. Estos resultados sugieren que al menos los pacientes P1 y P2, tienen activados los mecanismos de muerte celular programada de la célula, vía activación de caspasa 3.

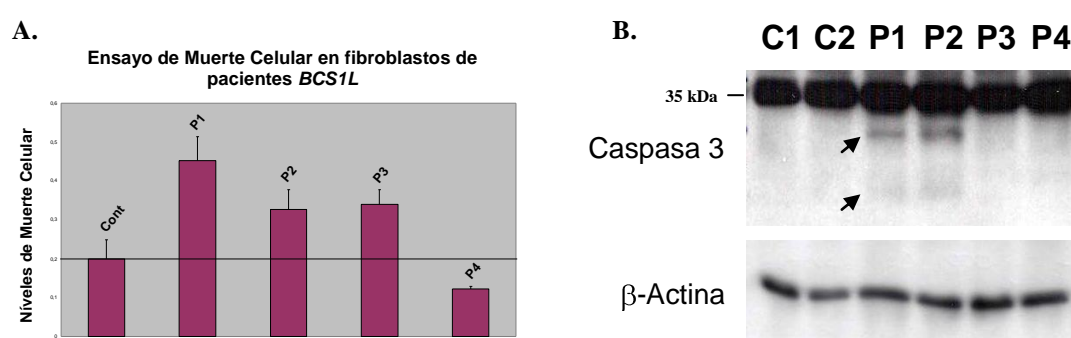


Figura 30. Análisis de los niveles de muerte celular programada en 4 pacientes portadores de mutaciones en *BCS1L*. **A.** Se muestra una gráfica con los niveles relativos de apoptosis medidos a partir de fibroblastos procedentes de nuestros pacientes. **B.** Electroforesis SDS-PAGE realizado con 30 μ g de un lisado total procedente de fibroblastos de los pacientes. Para el análisis por *Western-blot* se incubó un anticuerpo contra la proteína caspasa 3 y otro contra la subunidad β de la proteína actina como control de carga. La caspasa 3 es una proteína de 36 kDa que para activarse necesita un corte proteolítico. Dicho corte da lugar a dos bandas de tamaños 19 y 17 kDa, que en el panel se indican con una flecha.

DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO 2

En esta parte del trabajo se ha realizado un análisis genético y bioquímico comparativo en fibroblastos procedentes de pacientes que presentaban un déficit enzimático del complejo III en músculo, asociado a mutaciones en *BCS1L*. Nuestro principal objetivo era establecer correlaciones entre los defectos de ensamblaje o estabilidad de los complejos OXPHOS, la producción de especies reactivas del oxígeno, los niveles de las defensas antioxidantes, la morfología de la red mitocondrial y los niveles de apoptosis. El paciente P1, portaba la mutación c.296C>T (p.P99L) en homocigosis y los pacientes P2 y P3, portaban en heterocigosis las mutaciones c.133C>T (p.R45C) y c.166C>T (p.R56X) en el gen *BCS1L*. Estas 3 mutaciones han sido descritas previamente como patogénicas (de Lonlay *et al.*, 2001); (De Meirleir *et al.*,

2003). Estos 3 pacientes presentaban acidosis láctica, hepatopatía, hipotonía, sobrecarga de hierro y déficit enzimático de los complejos I y III de la cadena respiratoria en fibroblastos (salvo la actividad del complejo I en el paciente P3 que no ha sido determinada). Además, los pacientes P1 y P2 presentaban síntomas renales y los pacientes P2 y P3 (hermanos, De Meirleir *et al.*, 2003) tenían hipoglucemia. Estos 3 pacientes, que fallecieron antes del año de edad, presentaron prácticamente todos los síntomas clásicos del déficit enzimático del complejo III debido a mutaciones en *BCS1L* (acidosis láctica, tubulopatía, fallo hepático y muerte temprana) salvo encefalopatía, sólo presente en el paciente P2. Además, estos pacientes presentaron un síntoma clásico del síndrome de GRACILE, la sobrecarga de hierro (Fellman *et al.*, 1998; Visapää *et al.*, 2002), que anteriormente no se había descrito en los pacientes que presentaban déficit de la actividad enzimática del complejo III. Por ello, este signo clínico debería tenerse en cuenta a la hora de diagnosticar pacientes con déficit enzimático del complejo III. Sería interesante aclarar si la proteína BCS1L juega un papel más general en el metabolismo del hierro o si por el contrario tiene una función más específica como la participación en la biosíntesis y transporte de proteínas hierro-azufre (Fe-S). En este sentido, la subunidad RISP que se une al pre-complejo III a través de BCS1L, contiene un cluster Fe-S. Las proteínas Fe-S son esenciales en el transporte de electrones y en otras funciones celulares en la mitocondria, citosol y núcleo. La biosíntesis de los clusters Fe-S se lleva a cabo en el interior de la mitocondria, gracias a una docena de proteínas mitocondriales que están implicadas en el proceso y han sido identificadas en levaduras (Muhlenhoff y Lill, 2000). En esta línea sería importante desentrañar el posible papel de BCS1L en la regulación de la incorporación del cluster Fe-S en Rieske.

Los pacientes P4 y P6, han sido descritos en el capítulo 1. Brevemente, el paciente P4 presentaba en heterocigosis las mutaciones, c.166C>T (p.R56X), g.1181A>G y g.1164C>G. El paciente P6 presentaba la mutación c.148A>T (p.T50A) en homocigosis. Ambos pacientes cursaban hepatopatía y acidosis láctica al igual que los demás pacientes. El caso del paciente P5 es particular. Este paciente presentaba un déficit enzimático aislado del complejo III de la cadena respiratoria en músculo, aunque no en fibroblastos, además de acidosis láctica, hepatopatía y encefalopatía. Este paciente portaba en el alelo paterno la mutación R184C, descrita como patógena previamente (Fernández-Vizarra *et al.*, 2007; Hinson *et al.*, 2007). Sin embargo, en el alelo materno sólo portaba la nueva variante nucleotídica, g.1892A>G, presente en homocigosis. Esta variante, al igual que g.1433T>A publicada previamente (Visapää *et al.*, 2002), está localizada en el interior de una región intrónica, por lo que no hemos podido demostrar un posible efecto deletéreo de dicha variante. El hecho de que no se haya encontrado ninguna otra variante genética en el alelo materno sugiere que podría tratarse de un heterocigoto manifestado, como se ha descrito previamente con otros genes que codifican factores de ensamblaje de los complejos OXPHOS, como *SCO2* (Leary *et al.*, 2006).

Se ha descrito recientemente que a pesar de que BCS1L parece expresarse de manera ubicua, podría tener una función morfogenética en el desarrollo de las estructuras en el tubo neural en ratón (Kotarsky *et al.*, 2007). Esto podría explicar los fenotipos neurológicos encontrados en la mayoría de los pacientes con déficit del complejo III que portan mutaciones en *BCS1L*, como es el caso de los pacientes P1, P2, P5 y P6 descritos en esta tesis. Posiblemente en el paciente P3, que presentaba las mismas mutaciones que su hermano, el paciente P2, no se detectaran síntomas neurológicos debido a su temprano fallecimiento a las 3 semanas de su nacimiento.

Las mutaciones en *BCS1L* encontradas en los pacientes estudiados en esta tesis, provocan una disminución de los niveles del complejo BCS1L en la mitocondria. Sin embargo, los niveles de la proteína BCS1L en lisados celulares procedentes de estos pacientes eran comparables a los niveles control, al igual que ocurría en estudios previos en fibroblastos de pacientes con déficit del complejo III asociado a mutaciones en *BCS1L* (Fernández-Vizarra *et al.*, 2007). Una posible explicación sería que las mutaciones alterasen el importe de la proteína BCS1L dentro de la mitocondria. Los pacientes que tienen una disminución más severa de los niveles de BCS1L en la mitocondria, P2-P4 y P6, presentan mutaciones en el primer exón codificante (figura 23). Este exón comprende, tanto las regiones necesarias para el importe a la mitocondria y el correcto procesamiento de la proteína, como el dominio transmembrana. Mutaciones o alteraciones estructurales en esta región podrían comprometer la localización de BCS1L dentro de la mitocondria y, por tanto, sus funciones específicas. Por otro lado, los experimentos de inmunofluorescencia permitieron observar la localización mitocondrial de la proteína BCS1L, tanto en controles como en pacientes. De manera adicional, se observaron señales de fluorescencia que indicaban la localización de BCS1L en el exterior de las mitocondrias. Aunque no puede descartarse que se trate de un artefacto del experimento, una posible explicación de esta señal sería que BCS1L se encontrara en otros compartimentos celulares distintos a la mitocondria, desempeñando otras funciones. Alternativamente, podría ser que la disminución de BCS1L en la mitocondria se deba a una deslocalización celular de los ARNm de *BCS1L*. Los ARNm de *BCS1L* contienen en su región 3' UTR, un dominio de unión a la proteína Puf3p, la cual mantiene la localización cercana a la mitocondria de estos mensajeros (Saint-Georges *et al.*, 2008). Aunque no se ha encontrado ninguna variante genética en la región 3' UTR en estos pacientes, no se puede descartar que las mutaciones no afecten a la estructura secundaria de los ARNm de *BCS1L*, contribuyendo a su deslocalización.

En los geles de *blue native*, la proteína BCS1L se encontraba presente en el complejo BCS1L (~400 kDa). Además en los pacientes, BCS1L aparecía en dos estructuras de peso molecular más bajo, de ~200 y 100 kDa, respectivamente, lo que sugiere un problema de ensamblaje o de estabilidad del complejo BCS1L en estos pacientes. Dichas estructuras podrían corresponder a intermediarios de ensamblaje formados por repeticiones de la misma proteína, como es el caso de otras proteínas que, como BCS1L, pertenecen a la familia de las AAATPasas de unión a

nucleótidos (Vale, 2000; Ogura y Wilkinson, 2001). O bien, por unión de BCS1L a otras proteínas, como podría ser el caso de LETM1 (Tamai *et al.*, 2008). Sería interesante analizar la interacción de LETM1 y BCS1L en estos pacientes, puesto que se ha descrito que BCS1L podría estar ayudando al ensamblaje de LETM1, que tanto LETM1 como BCS1L ayudan a mantener la morfología mitocondrial y que fallos en LETM1 afectan al sistema OXPHOS (Tamai *et al.*, 2008). Además, fallos en los complejos de BCS1L y LETM1 se han asociado a fenotipos neurológicos de una manera independiente. El hecho de que den lugar al mismo tipo de fenotipos, también sugiere que podría existir una relación funcional de ambos factores (Tamai *et al.*, 2008).

De acuerdo con la disminución de los niveles de expresión de la subunidad RISP del complejo III en los pacientes P1-P4, en los ensayos de *blue-native* se observó una reducción en los niveles estacionarios del complejo III. Además, en los pacientes P1 y P4 se observó que la subunidad RISP se acumulaba en un subcomplejo de ~300 kDa, indicando un defecto de estabilidad o ensamblaje del complejo III. Como se comentó en resultados, este complejo no colocalizaba con el complejo BCS1L, de acuerdo a lo descrito anteriormente (Fernández-Vizarra *et al.*, 2007). Tampoco colocalizaba con ninguno de los subcomplejos de BCS1L detectados en nuestros pacientes. Los niveles de la subunidad RISP en los pacientes P5 y P6 eran comparables a los controles, sugiriendo que no hay un problema de estabilidad o ensamblaje del complejo III en los fibroblastos de estos pacientes. Por otra parte, el paciente P6 sí presentaba un defecto de ensamblaje del complejo III en músculo (ver capítulo 1). Este hecho puede deberse a un efecto más patogénico de las mutaciones en *BCS1L* en dicho tejido en comparación a los fibroblastos. Se han descrito situaciones similares en pacientes con mutaciones en *BCS1L* (de Lonlay *et al.*, 2001; Fernández-Vizarra *et al.*, 2007). El hecho de que disminuyan los niveles de la subunidad RISP y no los de la subunidad Core 2, se puede deber a que las mutaciones en *BCS1L* afectarían a los últimos pasos de ensamblaje del complejo III. De hecho se ha demostrado que en pacientes con mutaciones en *BCS1L*, el complejo III está parcialmente ensamblado en forma de un pre-complejo III, que puede dimerizar y unirse a otros complejos, aunque éste no sea funcional (Fernández-Vizarra *et al.*, 2007; Fernández-Vizarra *et al.*, 2009). En ese pre-complejo III estaría incorporada la subunidad Core 2, pero no la subunidad RISP.

En los pacientes P1-P4, los defectos de ensamblaje del complejo III iban asociados a defectos de ensamblaje de otros complejos. Concretamente, en 2 pacientes (P1 y P4) el déficit del complejo III iba acompañado de un ligero fallo en los niveles de ensamblaje del complejo IV, que en el caso del paciente P4 se veía reflejado en una disminución de su actividad enzimática. Este hecho podría atribuirse a que los defectos de ensamblaje, posiblemente inducidos por las mutaciones en *BCS1L*, estuvieran afectando a la función catalítica del complejo IV. En estudios previos en dos pacientes con déficit enzimático del complejo III asociado a mutaciones en *BCS1L*, se observó que el defecto de ensamblaje del complejo III afectaba a la actividad del

complejo IV, pero no a su ensamblaje (Fernández-Vizarra *et al.*, 2007), sugiriendo un papel regulador de BCS1L sobre la actividad del complejo IV. Además, 3 pacientes (P1, P2 y P3) presentaron un déficit enzimático combinado de los complejos I y III en fibroblastos, que iba acompañado de fallos de ensamblaje o estabilidad de dichos complejos. El caso de estos pacientes correlaciona con observaciones previas, en las que defectos de ensamblaje en el complejo III conducen a una pérdida secundaria del complejo I de la cadena respiratoria, lo que se manifestaría como un déficit combinado de los complejos III y I en humanos (Schägger, 2002; Schägger *et al.*, 2004; Acín-Pérez *et al.*, 2004). Un paciente (P5), presentaba un defecto único de ensamblaje en el complejo I en ensayos de *blue native*, que iba acompañado con un ligero déficit de la actividad enzimática en gel de este complejo, aunque no aparecía reflejado en las medidas enzimáticas espectrofotométricas. Esta inconsistencia podría deberse a la dificultad de medir la actividad del complejo I espectrofotométricamente. Ello se debe al gran tamaño de este complejo, de ahí la inaccesibilidad del complejo situado en la membrana interna mitocondrial, y a la insolubilidad del sustrato natural, la ubiquinona (coenzima Q) (Kirby *et al.*, 2007). No se puede descartar que este paciente porte, paralelamente, mutaciones en alguna subunidad del complejo I, ya que se han observado déficits combinados de los complejos I y III asociados a mutaciones en el gen nuclear *NDUFS4*, que codifica una subunidad del complejo I (Budde *et al.*, 2000). Los fibroblastos procedentes del paciente P6, que presentaban un déficit en la actividad enzimática del complejo III, no presentaban defectos aparentes de estabilidad o ensamblaje de ninguno de los distintos complejos de la cadena respiratoria, a pesar de los bajos niveles de BCS1L detectados en este paciente.

Estos resultados demuestran la existencia de alteraciones en los niveles de ensamblaje del complejo III en todos los pacientes. Por los siguientes motivos consideramos que los datos obtenidos apoyan la presencia de un defecto funcional de BCS1L: 1) La proteína Rieske Fe-S (RISP) se incorpora al complejo III cuando el factor de ensamblaje BCS1L es funcionalmente activo; 2) los niveles de la subunidad RISP en el complejo III están disminuidos en los pacientes P1-P4, y esta subunidad se acumula en un subcomplejo de peso molecular menor en dos pacientes, indicando un defecto en la estabilidad o ensamblaje del complejo III; y 3) todos los pacientes presentan un problema de ensamblaje o estabilidad del complejo BCS1L y la mayoría de ellos una reducción acusada de dicho complejo, como previamente se ha documentado en otros pacientes con mutaciones en *BCS1L* (Hinson *et al.*, 2007; Fernandez-Vizarra *et al.*, 2007; Blázquez *et al.*, 2009; Gil-Borlado *et al.*, 2009). Dado que RISP constituye una de las 3 subunidades necesarias para catalizar la transferencia de electrones en el complejo III, resulta lógico pensar que en los pacientes que presentan un déficit enzimático del complejo III, asociado a mutaciones en *BCS1L*, los bajos niveles de BCS1L podrían producir un defecto de la integración de RISP al complejo III y, por tanto, una pérdida de actividad de dicho complejo. Las mutaciones c.296C>T (p.P99L), c.133C>T (p.R45C), c.166C>T (p.R56X), g.1181A>G y

g.1164C>G, presentes en los pacientes (P1-P4) parecen relativamente más patogénicas que las mutaciones descritas en los pacientes P5 y P6. Estas mutaciones producen el ensamblaje anormal de otros complejos de la cadena respiratoria, lo que se traduce en un déficit del complejo III combinado con los complejos I y/o IV.

De forma adicional, se ha sugerido que las mutaciones en *BCSIL* que están asociadas a déficit del complejo III aumentarían la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Hinson *et al.*, 2007). Entre los pacientes que portan mutaciones en *BCSIL* estudiados en esta tesis, se observó un aumento significativo de los niveles de H_2O_2 en fibroblastos procedentes de los pacientes P1, P2, P3 y P4, mediante experimentos de inmunofluorescencia y de citometría de flujo. Se detectó un leve aumento de este parámetro en el paciente P5, mediante citometría de flujo y niveles de H_2O_2 similares a los niveles control en el paciente P6. Por tanto, no todas las mutaciones en *BCSIL* asociadas a un déficit enzimático del complejo III, producen un aumento en la producción de H_2O_2 . Al analizar los niveles de expresión de las defensas antioxidantes, encontramos que los niveles de la enzima Mn-SOD estaban disminuidos en los 4 pacientes analizados (P1-P4). Esto podría deberse a dos razones: o bien estos pacientes tienen una menor capacidad de incrementar su mecanismo de defensa frente a estrés oxidativo, o bien la producción de ROS es tan grande que incluso daña a las propias enzimas antioxidantes, lo cual llevaría a su degradación. La Mn-SOD es la primera línea de defensa antioxidante al encargarse de inactivar el primer radical que se produce, el anión superóxido, por lo que no resultaría extraño pensar que la proteína fuese dañada, como se ha observado previamente (Morán *et al.*, 2004). Este mecanismo explicaría los niveles más bajos de Mn-SOD en estos pacientes. Como podría esperarse, los niveles del enzima antioxidante catalasa se encontraron aumentados en estos 4 pacientes. De igual manera, los niveles de la defensa antioxidante GPx se encontraban aumentados en los pacientes P2-P4, mientras que estaban ligeramente disminuidos en el paciente P1.

En los pacientes estudiados en los que se detectaron niveles elevados de enzimas antioxidantes, podríamos pensar que las mutaciones en *BCSIL* conducen a un incremento en la producción de ROS, que a su vez las células tratan de contrarrestar aumentando la defensa antioxidante. Los pacientes P1-P4, que presentaron niveles elevados de H_2O_2 y una disminución de la enzima antioxidante Mn-SOD, posiblemente tienen un desequilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes de la célula. Aunque estas defensas están aumentadas en dichos pacientes, no lo están lo suficiente como para compensar la producción de ROS, lo que apoya un efecto más patogénico para las mutaciones descritas en estos pacientes. En el paciente P5, se puede observar un ligero incremento en los niveles de H_2O_2 en las células, mediante citometría de flujo, sugiriendo que un posible incremento de las defensas antioxidantes no sería suficiente para contrarrestar el aumento en la producción de ROS. En los fibroblastos del paciente P6, los niveles de H_2O_2 detectados fueron comparables a los de los fibroblastos control, lo que podría

indicar bien que la mutación no afecta a la producción de ROS, o bien que los niveles de la proteínas catalasa y Mn-SOD pueden ser capaces de mantener los niveles de ROS en el rango de la normalidad.

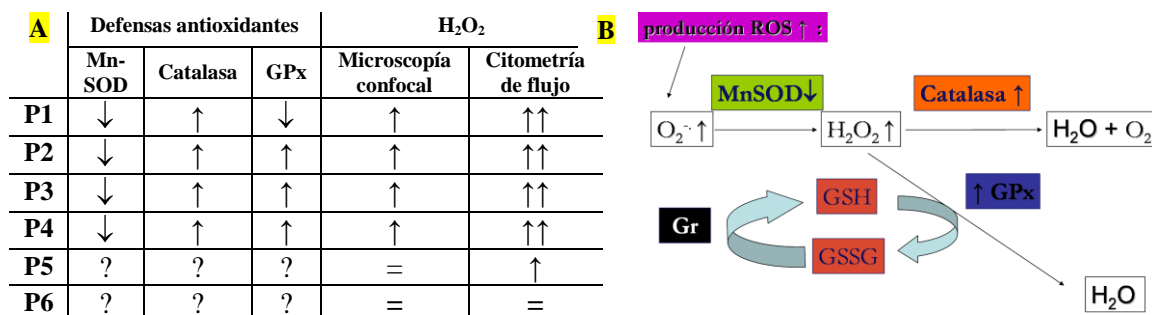


Fig 31. **A** Tabla de los niveles de la producción de H₂O₂ y de las defensas antioxidantes celulares en fibroblastos procedentes de los pacientes portadores de mutaciones en *BCSIL*. **B** Esquema general del desbalance entre la producción de H₂O₂ y los niveles de las defensas antioxidantes, en los pacientes que presentan mutaciones en *BCSIL* (P1-P6): un mal funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial conduce a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente, del anión superóxido, O₂⁻. Estas ROS son transformadas a H₂O mediante las defensas antioxidantes de la célula, principalmente: la enzima Mn-SOD, SOD-2 ó superóxido dismutasa mitocondrial, que reduce el O₂⁻ a H₂O₂; la GPx, glutatión peroxidasa y la Gr, glutatión reductasa, que reducen el H₂O₂ a H₂O en la matriz mitocondrial y la enzima catalasa, que reduce el H₂O₂ a H₂O en el peroxisoma. En los pacientes que presentan mutaciones en *BCSIL*, el aumento de H₂O₂ se ve reforzado por una disminución de los niveles de la defensa antioxidante Mn-SOD. Aunque los niveles de las enzimas catalasa y GPx están aumentados en estos pacientes, no se consiguen restaurar los niveles normales de H₂O₂, dando lugar a un estrés oxidativo. GSH, glutatión reducida; GSSG, glutatión oxidada.

En la figura 31A se resumen estos datos y en la figura 31B se muestra un esquema general del posible mecanismo que está teniendo lugar en los pacientes portadores de mutaciones en *BCSIL*.

Con anterioridad se ha encontrado relación entre los déficits enzimáticos del sistema OXPHOS y alteraciones de la disposición de la red mitocondrial (Koopman *et al.*, 2005; Verkaart *et al.*, 2007; Koopman *et al.*, 2007; Guillery *et al.*, 2008). De acuerdo con esto, en 4 pacientes (P1-P4) observamos alteraciones de la red mitocondrial. Dicha red se encontraba parcialmente fragmentada, más notoriamente en los pacientes P3 y P4. Esta fragmentación consiste en un mayor número de mitocondrias con formas filamentosas hinchadas, nudosas y ovoides como se describe previamente (Pham *et al.*, 2004). Por el contrario, en los pacientes P5 y P6 observamos que la red mitocondrial presentaba una apariencia filamentosas y sin alteraciones aparentes, comparable a los fibroblastos control. Todos estos datos sugieren que en los pacientes P1-P4, existe una correlación entre los defectos de ensamblaje del complejo III, el aumento en la producción de ROS y la existencia de alteraciones en la red mitocondrial. Sin embargo, los

pacientes P5 y P6, que no presentaban alteraciones de ensamblaje del complejo III ni un aumento en los niveles de H_2O_2 , tampoco mostraban alteraciones de la red mitocondrial en fibroblastos. Estos datos son consistentes con estudios previos en fibroblastos de pacientes con un déficit del complejo I, donde los cambios observados en la morfología mitocondrial fueron asociados con un aumento en los niveles de producción de ROS (Koopman *et al.*, 2007).

Previamente, se ha observado que la cadena respiratoria modula la apoptosis (Kwong *et al.*, 2007) posiblemente mediante la producción de ROS, y que en dicho proceso se encuentran implicadas las maquinarias de fusión y fisión mitocondrial (Suen *et al.*, 2008), aunque se desconocen los mecanismos. Los resultados de los estudios preliminares en nuestros pacientes, sugieren que al menos los pacientes P1 y P2, tienen activados los mecanismos de muerte celular programada de la célula vía activación de caspasa-3. Dados los antecedentes, cabría esperar una activación de otros mecanismos de muerte celular en los pacientes P3 y P4. Habría que realizar estudios más completos y extensivos a los pacientes P5 y P6, para entender mejor los mecanismos patogénicos de las mutaciones en *BCS1L* que afectan al sistema OXPHOS.

Como resumen y de un modo general, podemos decir que en los pacientes con déficit de complejo III asociado a mutaciones en el gen *BCS1L*: i) no disminuyen los niveles de expresión de la proteína BCS1L, pero sí los de RISP a nivel celular; ii) pueden existir fallos en la formación o estabilidad del complejo BCS1L en la mitocondria y, por ende, del complejo III; iii) el ensamblaje anormal de otros complejos de la cadena respiratoria parece depender de la mutación, apareciendo como un defecto aislado del complejo III o combinado con los complejos I y/o IV; iv) puede existir un aumento de la producción de ROS y, por tanto, una activación general de las defensas antioxidantes; v) se pueden producir cambios en la morfología mitocondrial; y vi) una activación del mecanismo de muerte celular programada en algunos de los pacientes. Para finalizar, parece existir una relación entre los fenotipos fisiopatológicos celulares observados y la gravedad de la presentación clínica en los pacientes portadores de mutaciones en *BCS1L*. Los pacientes P1-P4, que presentaban defectos de ensamblaje del complejo III combinado con los complejos I y/o IV, acompañados de un aumento en la producción de ROS y alteraciones de la red mitocondrial, cursaron con las formas clínicas más graves, en las que los pacientes fallecieron antes del año de edad. Sin embargo, los pacientes P5 y P6, que no presentaron aumentos en la producción de ROS ni alteraciones de la red mitocondrial, presentaron cuadros clínicos relativamente menos severos, habiendo superado el año de edad en ambos casos. Por tanto, nuestros resultados avalan la importancia de realizar estudios bioquímicos y celulares que revelen los mecanismos moleculares que provocan los defectos de *BCS1L*.

CAPÍTULO 3:

Análisis del ensamblaje de los distintos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en pacientes con déficit enzimático del complejo III sin causa genética conocida

Estudios recientes han demostrado que un correcto ensamblaje del complejo III es esencial para la formación, estabilidad y funcionamiento del respirasoma mitocondrial. En este sentido se ha propuesto que mutaciones que conduzcan a fallos en el ensamblaje o estabilidad del complejo III probablemente producirán una reducción de la actividad y niveles estacionarios de otros complejos OXPHOS, especialmente, del complejo I. Por el contrario, mutaciones que no conlleven defectos de ensamblaje del complejo III, conducirán a un déficit enzimático único de dicho complejo. (Acín-Pérez *et al.*, 2004; Schagger *et al.*, 2004; Blakely *et al.*, 2005). Estos estudios se han visto confirmados por el hallazgo de mutaciones en el gen *CYTB*, MIM 516020, que se pueden asociar tanto a un déficit aislado del complejo III, como a un déficit combinado de los complejos I y III (Lamantea *et al.*, 2002). Por este motivo nos preguntamos que ocurría con el ensamblaje de los distintos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en pacientes con déficit enzimático primario del complejo III. Nuestros primeros estudios en pacientes portadores de mutaciones en *BCS1L* mostraban, como hemos visto anteriormente en el capítulo 2, un defecto aislado de ensamblaje del complejo III o combinado con otros complejos dependiendo de la mutación.

Para realizar este análisis, se contaba con una serie de 23 pacientes que presentaban déficit enzimático primario del complejo III en músculo, para el que no se ha encontrado una causa genética. De estos 23 pacientes, 16 tenían un déficit aislado del complejo III, 5 un déficit combinado de los complejos III+I y 2 un déficit combinado de los complejos III+IV en homogenado muscular. Se secuenció el gen completo de *CYTB* en estos pacientes, descartándose la presencia de mutaciones patogénicas en este gen. Sólo en el caso del paciente P10, se encontró un polimorfismo raro en *CYTB* no descrito previamente, que fue caracterizado en el apartado 1.1.1.

Para poder realizar un estudio de ensamblaje comparativo se agruparon dichos pacientes en 4 grupos, dependiendo de si presentaban un déficit aislado o combinado del complejo III, así como de qué tejido o espécimen se disponía para realizar el ensayo: i) Pacientes con déficit aislado del complejo III de los que se disponía de homogenado muscular (P7-P19). ii) Pacientes con déficit combinado de los complejos III y I (P20-P24) de los que se disponía de homogenado muscular. iii) Pacientes de los cuales se disponía de fibroblastos además de homogenado muscular (P10, P18 y P25) para realizar el estudio de ensamblaje. Estos 3 pacientes presentaban un déficit combinado de los complejos III y IV en dicho tejido. Por último, iv) se realizó un experimento con un grupo de pacientes con un déficit aislado o combinado del complejo III de los que sólo se disponía de fibroblastos para realizar dicho estudio (P26-P29).

Un resumen de las características clínicas de todos estos pacientes se ha recogido en las tablas 7, 8 y 9, respectivamente.

3.1. ESTUDIOS DE ENSAMBLAJE EN HOMOGENADO MUSCULAR

3.1.1. Estudio de ensamblaje realizado en homogenado muscular procedente de los pacientes con un déficit aislado del complejo III

Para este estudio se contaba con una serie de 13 pacientes que presentaban un déficit enzimático aislado del complejo III en músculo, en los que no se ha encontrado causa genética para la enfermedad y de los cuales se disponía de homogenado muscular (pacientes P7-P19, tabla 7).

Se realizó electroforesis en geles *blue-native* (BN-PAGE) de primera dimensión (1D) con mitocondrias extraídas, mediante centrifugación diferencial y dodecil maltosido (DDM), de homogenados musculares procedentes de controles y de los 13 pacientes (figura 32). Los análisis de *Western-blot* fueron realizados con anticuerpos contra las siguientes subunidades OXPHOS: NDUFA9 (complejo I, CI); Core 2 (complejo III, CIII), COX II y COX5A (complejo IV, CIV) y *sdhA* (complejo II, CII). Además, la señal obtenida con un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína BCS1L se muestra en el panel inferior de la figura 32 en la mayoría de los pacientes. En la tabla 7 se muestra un resumen de los defectos de estabilidad o ensamblaje observados en músculo de esta serie de pacientes. En ellos, de forma inesperada, se observaron 6 fenotipos de ensamblaje distintos: i) fallos de ensamblaje o estabilidad del complejo III aislado, como era el caso de los pacientes P12 y P15; ii) fallos de ensamblaje combinados de los complejos III y I, como era el caso del paciente P9; iii) fallos de ensamblaje combinados de los complejos III y IV, como es el caso del paciente P18; iv) fallos de ensamblaje combinados de los complejos I, III y IV, como presentaban los pacientes P10, P11 y P17. En el caso del paciente P10 esto iba acompañado de un fallo de ensamblaje del complejo II, lo que sugiere que esta muestra ha sufrido una degradación; v) fallos únicos del complejo I, sorprendentemente, como tenía el paciente P16; y vi) no existían fallos de ensamblaje en ninguno de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, como era el caso de los pacientes P7, P8, P13, P14 y P19.

Además, cuando se realizó la incubación en estas muestras con un anticuerpo contra la subunidad NDUFA9 se observaron uno o dos intermediarios de ensamblaje del complejo I con un peso molecular de ~650 kDa, descritos previamente (Ugalde *et al.*, 2004). Estos intermediarios también se encontraron disminuidos en los pacientes P7, P11, P15, P16, P17 y P18, lo que sugiere adicionalmente un problema de ensamblaje o estabilidad de este complejo. Por último, los análisis de *Western-blot* realizados con un anticuerpo contra la proteína BCS1L en los pacientes P7-P16, mostraron una reducción en la cantidad del complejo BCS1L en los homogenados de los pacientes P11 y P15, sugiriendo que la causa genética responsable de la enfermedad en estos dos pacientes podría hallarse en este gen.

Paciente	Género	Inicio de síntomas	Origen genético	% Act. CIII en músculo	Otro déficit enzimático	Defecto de Ensamblaje	Fenotipos clínicos
P7	Varón	4 meses	NC	98	no	no	Miocardia dilatada hipertrofica, ectasia pielocalicial.
P8	Varón	28 años	NC	80	CI-límite	no	Hipertrofia muscular en pantorrillas, calambres.
P9	Mujer	59 años	NC	98	no	CI+CIII	Parestesia, cambios miopáticos ligeros EMG, CK elevada.
P10	Varón	RN	NC	52	CIV-fibros (31%)	CI+CIII+CIV+CII	AL, ataques epilépticos, mioclonías, antecedentes familia materna.
P11	Varón	55 años	NC	70	no	CI+CIII+CIV	Encefalopatía, miopatía, ataques epilépticos, AL, FRRs.
P12	Mujer	15 años	NC	79	no	CIII	FRRs, anorexia nerviosa, cambios miopáticos ligeros EMG, PM.
P13	Varón	2 años	NC	99	no	no	Hipotonía, espasmos epilépticos, signos miopáticos, PM.
P14	Varón	RN	NC	62	no	no	Alteración en la deglución, encefalopatía, tetraparesia espástica, distenia, atrofia cerebelosa, retraso psicomotor severo, pira y extrapiramidalismo, delección multiple del ADNmt.
P15	Mujer	70 años	NC	83	CI-límite	CIII	Ptois, debilidad proximal de extremidades, miopatía mitocondrial con FRRs.
P16	Varón	13 años	NC	85	no	CI	Esferocitosis hereditaria, retraso psicomotor, ptois, fatigabilidad, hiperactividad y contractura involuntaria de diversos músculos, hiperlaxitud articular, quistes sebáceos en cuero cabelludo y vestibulo izquierdo, falta atención.
P17	Mujer	47 años	NC	90	no	CI+CIII+CIV	Encefalomiopatía generalizada, ictus isquémico.
P18	Varón	2 meses	NC	42	CIV-fibros (22%)	CIII+CIV	Síndrome de Leigh, encefalopatía asociada a: hipoacusia, dismorfas, síndrome oftalmológico, lesiones de ganglios basales, retraso mental, pobre motilidad ocular. Antecedentes familiares.
P19	Mujer	40 años	NC	95	no	no	Ptois fluctuante.

Tabla 7. Las actividades enzimáticas (Act.) fueron medidas por duplicado en al menos dos muestras independientes derivadas del paciente. Los valores para la actividad residual del complejo III (CIII) en homogenado muscular se dan como porcentaje del valor del control más bajo (100%) después de la normalización con la enzima de matriz mitocondrial citrato sintasa. Las actividades del resto de complejos fueron normales, salvo las especificadas en la columna correspondiente. En los pacientes P10 y P18, la actividad enzimática anormal del complejo IV, se ha resaltado en rojo, expresándose como un porcentaje respecto de la actividad enzimática del control más bajo. AL, acidosis láctica; FRRs, fibras rojo rasgadas; PM, proliferación mitocondrial; RN, recién nacido; EMG, electromiograma; CK, creatin quinasa; fibros: fibroblastos y NC, no conocido.

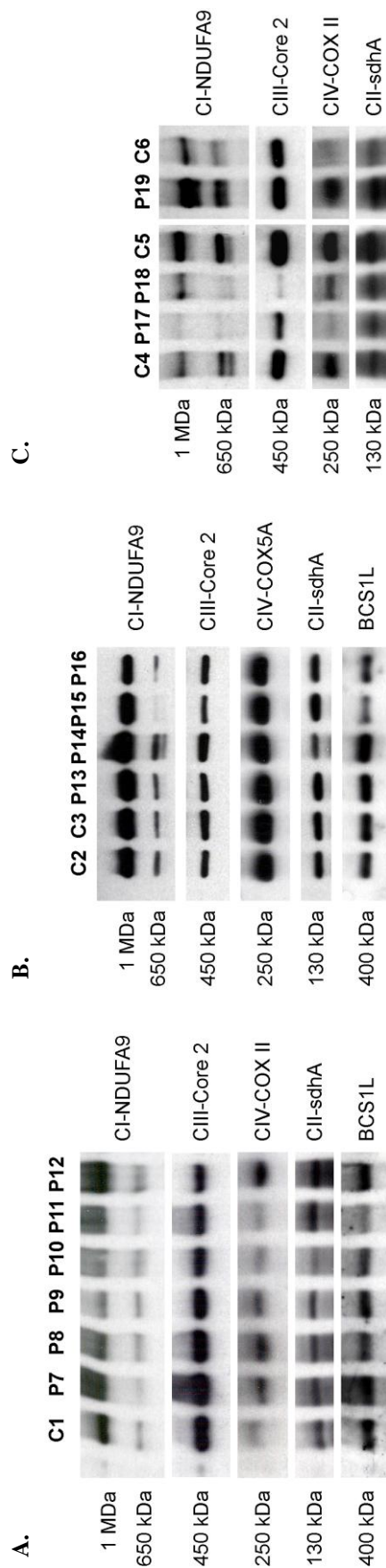


Figura 32. Análisis de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial mediante BN-PAGE realizado en homogenados musculares de pacientes que presentaban un déficit enzimático aislado del complejo III en dicho tejido. **A.** BN-PAGE de los pacientes (P7-P12). El caso del paciente P10 es un caso especial que se ha detallado anteriormente en el apartado 1.1.1. **B.** BN-PAGE de los pacientes (P13-P16). **C.** BN-PAGE de los complejos multiproteicos fue analizada con 30 µg de mitocondria aislada en un gradiente del 4-15% de acrilamida/bisacrilamida BN-PAGE. Para el análisis por *Western-blot* se incubaron anticuerpos contra las siguientes subunidades OXPHOS: NDUFA9 (complejo I, CI); Core 2 (complejo III, CIII); COX II y COXVa (complejo IV, CIV) y sdhA (complejo II, CII). La señal obtenida con un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína BCS1L se muestra en el panel inferior.

Se seleccionaron los pacientes P8 y P18, de los cuales se disponía de suficiente muestra de homogenado muscular para realizar geles de segunda dimensión (2D). El paciente P8 no presentaba en geles de 1D un defecto de ensamblaje y el paciente P18 presentaba un defecto de ensamblaje de los complejos III y IV. En geles 2D, los análisis de *Western-blot* realizados con un anticuerpo contra la subunidad Core 2 del complejo III, mostraban una reducción notable en la cantidad de dicha subunidad incorporada al complejo III en el paciente P18. Sin embargo, en el paciente P8, al igual que en los geles de 1D, los niveles de dicha subunidad eran comparables a los niveles control (figura 33). Asimismo, los niveles correspondientes a los supercomplejos III_2+IV y $\text{I}+\text{III}_2$ también se encontraron disminuidos en el paciente P18. Además, se utilizaron anticuerpos contra las proteínas NDUFS3 y NDUFA9 del complejo I para ver los niveles de dichas subunidades en el músculo de estos pacientes. En el paciente P18 se observó una reducción en los niveles de la subunidad NDUFA9 al igual que en la 1D, mientras que los niveles de NDUFS3 fueron normales. En el paciente P8 no hubo una disminución apreciable de los niveles de ensamblaje del complejo I. Además, se utilizó un anticuerpo contra la subunidad COX II del complejo IV y se observó que los niveles de dicha subunidad resultaron normales en el paciente P8, pero llegaron a ser casi indetectables en el paciente P18 (figura 33).

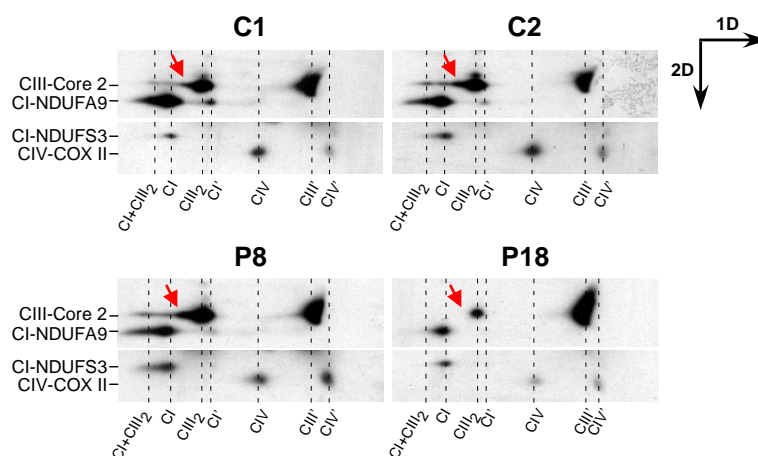


Figura 33. Análisis de distintas subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial mediante 2D-BN/SDS-PAGE realizado en homogenados musculares de controles (C1 y C2), y de los pacientes P8 y P18. Para el análisis por *Western-blot* se incubaron anticuerpos contra las siguientes subunidades OXPHOS: NDUFS3 y NDUFA9 (complejo I, CI), Core 2 (complejo III, CIII) y COX II (complejo IV, CIV), indicados a la izquierda. Las flechas situadas en el margen superior derecho indican las direcciones de la primera y la segunda dimensión. Las flechas rojas que se encuentran en el interior de los paneles indican el supercomplejo III_2+IV . En la figura se indica el supercomplejo $\text{I}+\text{III}_2$ ($\text{CI}+\text{CIII}_2$). CI' , subcomplejo D del complejo I de ~400 kDa descrito previamente (Ugalde *et al.*, 2004); CIII' y CIV' corresponden a las subunidades Core 2 del complejo III y COX II del complejo IV, respectivamente, que no se han incorporado al complejo ni a ningún subcomplejo y avanzan con el frente de electroforesis.

En el paciente P8 se encontraron niveles relativos aumentados de la subunidad COX II no incorporada al complejo IV respecto a los controles (indicado en la figura 33 como CIV'), lo que sugiere un problema de ensamblaje o estabilidad de dicho complejo.

Por tanto, el grupo mayoritario de pacientes con déficit aislado de la actividad enzimática del complejo III en músculo, no presentaba defectos en el ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo, en la mitad de los otros casos se observaron defectos de ensamblaje del complejo III de manera aislada, o fallos de ensamblaje del complejo III de manera combinada con los complejos IV y/o I, que no necesariamente se traducían en una disminución de la actividad enzimática de dichos complejos. Se observó un paciente con déficit enzimático aislado del complejo III mitocondrial que sólo presentaban un defecto de ensamblaje del complejo I (como ocurría en fibroblastos del paciente 5, portador de la mutación R184C en *BCS1L*, figura 26).

3.1.2. Estudio de ensamblaje en homogenado muscular de pacientes con déficit combinado de los complejos III y I

Para este estudio se contaba con una serie de 5 pacientes que presentaban un déficit enzimático combinado de los complejos III y I en músculo (P20-P24, tabla 8), en los que no se ha encontrado causa genética para la enfermedad y de los cuales se disponía de homogenado muscular para realizar el estudio de ensamblaje.

Se llevaron a cabo electroforesis en geles *blue-native* (BN-PAGE) de primera dimensión (1D) con mitocondrias extraídas mediante centrifugación diferencial y dodecil maltosido (DDM) de homogenados musculares procedentes de controles y de los 5 pacientes (figura 34). Los análisis de *Western-blot* fueron realizados con anticuerpos contra las siguientes subunidades OXPHOS: NDUFA9 (complejo I, CI); Core 2 (complejo III, CIII), COX II (complejo IV, CIV) y sdhA (complejo II, CII). De acuerdo con esto, se ha recogido en la tabla 8 un resumen de los defectos de estabilidad o ensamblaje observados en esta serie de pacientes. Se pudieron observar 3 fenotipos de ensamblaje distintos: i) por un lado, el paciente P20 presentaba un defecto único de ensamblaje del complejo I en músculo; ii) el paciente P21 presentaba un defecto de ensamblaje combinado de los complejos I, III y IV en músculo, y iii) los pacientes P22, P23 y P24 no presentaban defectos en la estabilidad o ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (figura 34).

Estos resultados sugieren que los déficits enzimáticos del complejo III combinados con déficits enzimáticos del complejo I en músculo de pacientes, no necesariamente tienen que ir asociados a un defecto en el ensamblaje del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial, como en

Paciente	Género	Inicio de síntomas	Origen genético	% Act. CIII en músculo	% Act. CI en músculo	Defecto de Ensamblaje	Fenotipos clínicos
P20	Varón	19 años	NC	76	79	CI	Intolerancia al ejercicio, fatiga, mialgias.
P21	Mujer	53 años	NC	76	45	CI+CIII+CIV+CII	FRRs aisladas, debilidad proximal.
P22	Mujer	RN	NC	98	83	no	Sordera neurosensorial, retraso mental, insuficiencia renal, PM, aumento de lípidos. Hermano afectado.
P23	Varón	4 años	NC	75	88	no	Immunodeficiencia congénita, distrofia neurológica progresiva, ictus, deficiencia CoQ10, atrofia muscular e hipotonía, retraso mental leve, epilepsias, ataxia. RIP.
P24	Mujer	RN	NC	24	88	no	Cardiomiopatía hipertrofica, esteatosis hepática y miocárdica, aumento de lípidos, hipotonía, hipoglucemia, alteraciones respiratorias y de succión. RIP.

Tabla 8. Las actividades enzimáticas (Act.) fueron medidas por duplicado en al menos dos muestras independientes derivadas del paciente. Los valores para las actividades residuales de los complejos I (CI), III (CIII) y IV (CIV) en homogenado muscular se dan como porcentaje del valor del control más bajo (100%) después de la normalización con la enzima de matriz mitocondrial citrato sintasa. Las actividades del resto de complejos fueron normales. FRRs, fibras rojo rasgadas; PM, proliferación mitocondrial; RN, recién nacido; NC, no conocido; RIP, fallecido.

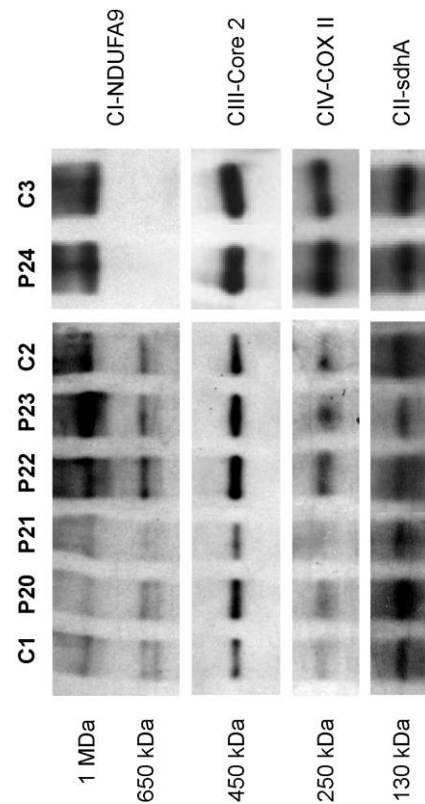


Figura 34. Análisis de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, mediante BN-PAGE realizado en homogenados musculares de los pacientes P20-P24, que presentaban un déficit enzimático combinado de los complejos III y I de la cadena respiratoria mitocondrial. La separación de los complejos multiproteicos fue analizada con 30 µg de mitocondria aislada con digitonina en un gradiente del 4-15% de acrilamida/bisacrilamida BN-PAGE. Para el análisis por *Western-blot* se incubaron anticuerpos contra las siguientes subunidades OXPHOS: NDUFA9 (complejo I, CI); Core 2 (complejo III, CIII), COX II (complejo IV, CIV) y sdhA (complejo II, CII).

el caso de los pacientes (P22-P24). Sin embargo, podrían ir asociados a defectos de ensamblaje del complejo I de manera aislada (P20) o combinada con los complejos III y IV (P21). En las muestras de estos pacientes, los fallos de ensamblaje no correlacionaban con los niveles de actividad enzimática ni con la clínica de los pacientes, puesto que los pacientes P23 y P24, que no presentaban defectos en el ensamblaje, tenían la clínica más grave y fallecieron a lo largo de la enfermedad.

3.2. ESTUDIOS DE ENSAMBLAJE EN FIBROBLASTOS

3.2.1. Estudio de ensamblaje realizado en fibroblastos procedentes de los pacientes P10, P18 y P25, con déficit combinado de los complejos III y IV en dicho tejido

Se realizó un estudio de ensamblaje con un grupo reducido de 3 pacientes (P10, P18 y P25). Se disponía de fibroblastos de los pacientes P10 y P18, además de homogenado muscular, para llevar a cabo los estudios de ensamblaje (tabla 7). Estos 2 pacientes presentaron en músculo un déficit enzimático aislado del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial, acompañado de defectos de estabilidad o ensamblaje de los complejos I, III y IV (apartado 3.1.1). Del paciente P25, sólo se disponía de fibroblastos para dicho estudio (tabla 10). Como se puede ver en las tablas 7 y 10 de actividades enzimáticas de fibroblastos, estos 3 pacientes presentaban un déficit enzimático de los complejos III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial en dicho tejido.

Se realizaron electroforesis en geles *blue-native* (BN-PAGE) de primera dimensión (1D) con mitocondrias extraídas con digitonina y dodecil maltosido (DDM) de fibroblastos procedentes de controles y de los 3 pacientes (figura 35A). Se utilizaron dos anticuerpos contra las proteínas RISP y Core 2 del complejo III para ver los niveles de expresión del complejo III (~450 kDa) en fibroblastos de los pacientes. Dichos niveles, estaban claramente disminuidos en el paciente P18. Además, en el paciente P10 se pudo observar que la subunidad RISP se acumulaba en un subcomplejo de ~300 kDa que estaba ausente en las muestras control y en los demás pacientes, sugiriendo un defecto en la estabilidad o ensamblaje del complejo III. Esta banda ha sido previamente observada en los pacientes P1 y P4 con mutaciones en el gen *BCS1L* (apartado 2.4). Además, la señal que corresponde al supercomplejo III₂+IV (~650 kDa) también estaba disminuida en los pacientes P10 y P18, lo que se observaba claramente cuando se usó un anticuerpo contra la subunidad Core 2 del complejo III (tercer panel, figura 35A). De acuerdo con estos datos, los niveles del complejo IV, también estaban ligeramente disminuidos en los pacientes P10 y P18, respecto a los controles, cuando se realizó un *Western-blot* usando un anticuerpo contra la subunidad OXPHOS, COX5A (figura 35A). Dichos niveles eran normales

en el paciente P25. Sin embargo, el ensayo de actividad en gel (IGA) del complejo IV mostraba un defecto en la actividad enzimática en los 3 pacientes (figura 35B).

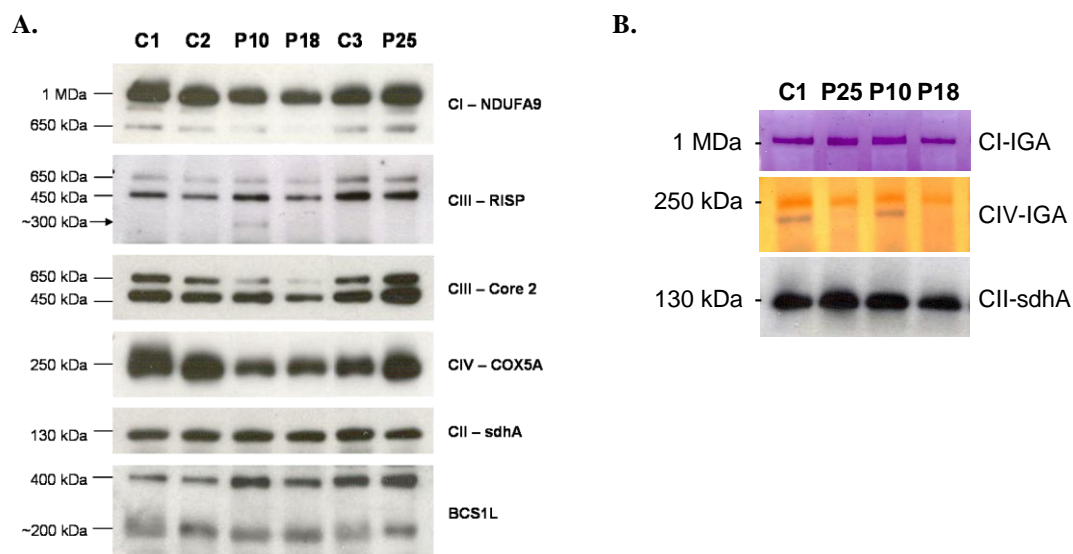


Figura 35. A. Análisis de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial mediante BN-PAGE realizado en fibroblastos de los pacientes P10, P18 y P25. La separación de los complejos multiproteicos fue analizada con 30 μ g de mitocondria aislada con digitonina en un gradiente del 4-15% de acrilamida/bisacrilamida BN-PAGE. Estos geles se hicieron por duplicado para los ensayos de actividad en gel (IGAs) del complejo I (panel superior de **A.** y **B.**) y del complejo IV (segundo panel de **B.**). Para el análisis por *Western-blot* se incubaron anticuerpos contra las siguientes subunidades OXPHOS: NDUFA9 (complejo I, CI), Core 2 y Rieske hierro-azufre (RISP) del complejo III (CIII, 450 kDa), COX5A (complejo IV, CIV) y sdhA (complejo II, CII). La señal que corresponde al supercomplejo III₂+IV (~650 kDa) está indicada en los paneles segundo y tercero. Un subcomplejo de 300 kDa del complejo III se indica con una flecha en el segundo panel. La señal obtenida con un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína BCS1L se muestra en el panel inferior.

Estos datos sugerían un posible defecto funcional del factor de ensamblaje BCS1L. Sin embargo, los análisis de *Western-blot* realizados con un anticuerpo monoclonal contra la proteína BCS1L mostraban niveles comparables en la cantidad del complejo BCS1L de ~400 kDa en los fibroblastos de los 3 pacientes y los controles. Además, este anticuerpo reconocía a la proteína BCS1L en una estructura molecular de ~200 kDa. Este subcomplejo no colocalizaba con el subcomplejo de RISP de ~300 kDa como se mostró previamente (Fernández-Vizarra *et al.*, 2009). Los niveles del complejo I de la cadena respiratoria estaban ligeramente disminuidos en el paciente P18 y eran normales en los pacientes P10 y P25 cuando se realizó un *Western-blot* usando un anticuerpo contra la subunidad OXPHOS, NDUFA9 (figura 35A). Además, el ensayo de actividad en gel (IGA) del complejo I mostraba niveles comparables en la actividad enzimática de los pacientes P10 y P25, respecto de los controles (figura 35B), mientras que disminuía en el paciente P18. Se utilizó un anticuerpo contra la subunidad de sdhA del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial como control de carga.

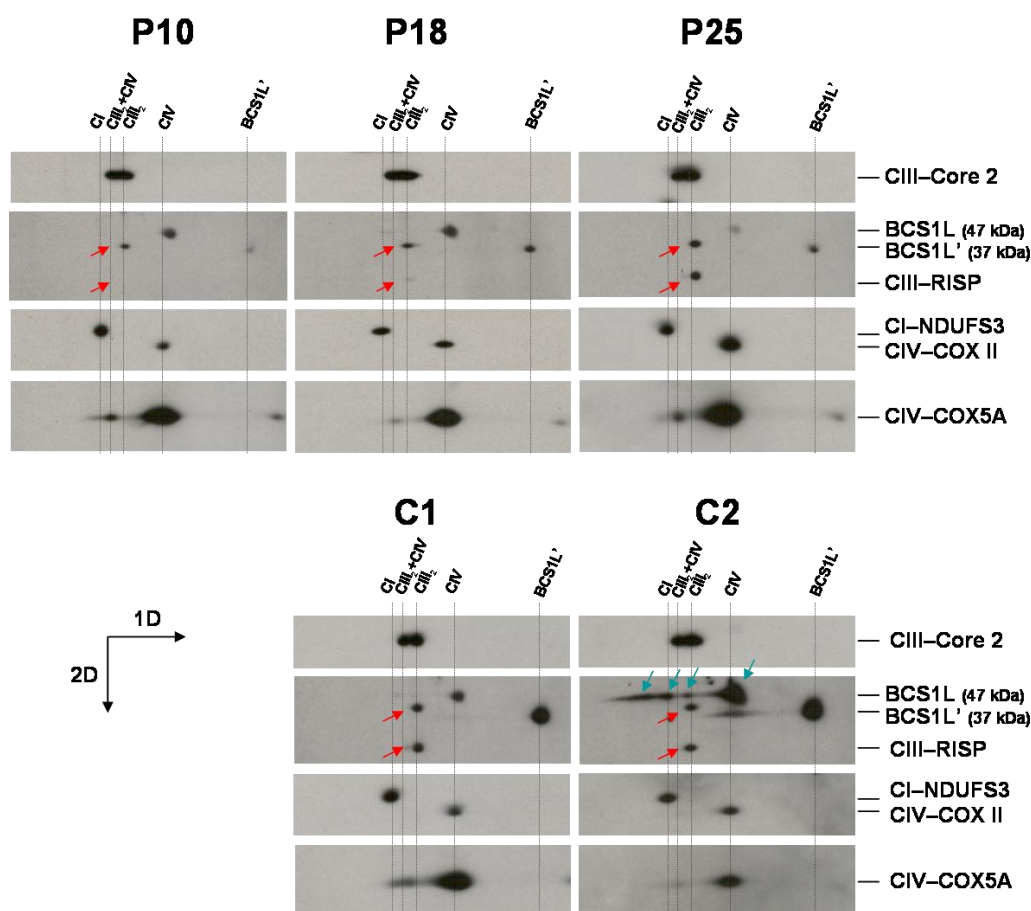


Figura 36. Análisis de distintas subunidades de la cadena respiratoria mitocondrial mediante 2D-BN/SDS-PAGE realizado en fibroblastos de controles (C1 y C2), y de los pacientes P10, P18 y P25. Para el análisis por *Western-blot* se incubaron anticuerpos contra las siguientes subunidades OXPHOS: NDUFS3 (complejo I, CI), Core 2 y RISP (complejo III, CIII) y COX II y COX5A (complejo IV, CIV), indicados a la derecha. Las señales obtenidas con un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína BCS1L se muestran en el segundo panel junto con RISP. Las flechas azules en el segundo panel del control C2 muestran estructuras de peso molecular alto donde se encuentra la proteína BCS1L. Las flechas rojas indican la señal que corresponde a la proteína RISP (la señal de mayor peso molecular corresponde posiblemente al precursor de RISP y la de menor peso molecular a RISP madura). Las flechas negras indican las direcciones de la primera y la segunda dimensión.

En los gels de segunda dimensión (2D), los análisis de *Western-blot* realizados con un anticuerpo contra la subunidad OXPHOS, Core 2, mostraban niveles comparables en la cantidad de dicha subunidad incorporada al complejo III en todos los pacientes respecto de los controles; mientras que los niveles de la subunidad RISP madura, estaban claramente disminuidos en los pacientes P10 y P18, pero no en el paciente P25 (figura 36). Además, el anticuerpo utilizado contra la subunidad RISP, reconoce una estructura de mayor peso molecular a la altura del complejo III, que correspondería a la subunidad RISP inmadura. Dicha señal también estaba disminuida en los pacientes P10 y P18. Los análisis de *Western-blot* realizados con un

anticuerpo monoclonal contra la proteína BCS1L mostraban que dicho anticuerpo reconocía, o bien dos proteínas diferentes o bien dos isoformas distintas de la misma proteína: la proteína BCS1L de 47 kDa y la otra señal de 37 kDa a la que hemos llamado BCS1L'. Tanto BCS1L como BCS1L' colocalizaban en la estructura de ~200 kDa observada en la 1D. La señal de 47 kDa estaba disminuida en los pacientes P10 y P25 pero no en el paciente P18, mientras que la señal de 37 kDa estaba disminuida en los 3 pacientes respecto de los controles. En uno de los controles (C2) el complejo BCS1L, además, estaba presente en estructuras de mayor peso molecular (figura 36) de ~700 kDa y 1 MDa, lo que sugiere que podría estar ayudando al ensamblaje, además del complejo III, de los supercomplejos. Se utilizó un anticuerpo contra la proteína NDUFS3 para ver los niveles del complejo I en los fibroblastos de estos pacientes, y se observó que dichos niveles estaban ligeramente disminuidos en el paciente P18, lo que confirmaba los datos de geles de 1D. Además, se observó que los niveles del complejo IV estaban ligeramente reducidos en los pacientes P10 y P18, al utilizar el anticuerpo contra la subunidad COX II y eran normales en el paciente P25, mientras que no se apreciaban diferencias en ninguno de los pacientes cuando se utilizó el anticuerpo contra la subunidad COX5A (figura 36, tercer y cuarto panel).

Estos resultados sugieren que los defectos de ensamblaje del complejo III pueden conducir a déficits de las actividades enzimáticas de los complejos I, III y IV en fibroblastos de pacientes, tal y como se ha observado anteriormente, en fibroblastos de pacientes con mutaciones en el gen *BCS1L*. Además, los fibroblastos de estos 3 pacientes presentaban un déficit enzimático del complejo IV que es consistente con un defecto de ensamblaje de dicho complejo en los pacientes P10 y P18. La ausencia de fallos de ensamblaje en el complejo IV en el paciente P25, sin embargo, sugiere un defecto puramente catalítico de este complejo.

3.2.2. Estudio de ensamblaje realizado en fibroblastos procedentes de pacientes con déficit enzimático aislado del complejo III, o combinado con un déficit de los complejos I ó IV

Para este estudio se contaba con una serie de 4 pacientes con un déficit aislado o combinado del complejo III en músculo, en los que no se ha encontrado causa genética para la enfermedad y de los que sólo se disponía de fibroblastos para realizar dicho estudio (P26-P29, tablas 9 y 10).

En la tabla 9, aparecen recogidas las actividades enzimáticas de los complejos I, III y IV en el músculo de estos pacientes. Como se puede observar los pacientes P27, P28 y P29, presentaban un déficit aislado del complejo III en músculo, mientras que el paciente P26 presentaba un déficit combinado de los complejos III y IV. En la tabla 10 se recogen las actividades enzimáticas de los complejos I, III y IV en fibroblastos de estos mismos pacientes. Todas las actividades estaban dentro de los valores del rango control, con la única excepción de la actividad del complejo I en el paciente P27, que se encontraba disminuida. Curiosamente, la

actividad del complejo III en fibroblastos del paciente P28 se encontraba muy por encima de los valores del rango control. Como se ha observado en el apartado 2.2, los déficits enzimáticos de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial eran más acusados en músculo que en fibroblastos.

Se realizaron electroforesis en geles *blue-native* (BN-PAGE) de primera dimensión (1D) con mitocondrias extraídas con digitonina y dodecil maltosido (DDM) de fibroblastos procedentes de controles y de los pacientes P26-P29 (figura 37). Inicialmente, se utilizó un anticuerpo contra la subunidad RISP del complejo III para ver los niveles del homodímero de dicho complejo (~450 kDa), los cuales se encontraron ligeramente disminuidos en todos los pacientes respecto al control. Sin embargo, esta disminución no se observó cuando se utilizó un anticuerpo contra la subunidad Core 2 de este mismo complejo, sugiriendo un defecto de ensamblaje en las últimas fases de este proceso. Los análisis de *Western-blot* realizados con un anticuerpo contra la proteína BCS1L mostraron niveles comparables en la cantidad del complejo BCS1L de ~400 kDa en los fibroblastos de estos 4 pacientes respecto al control (figura 37). Los niveles del complejo I de la cadena respiratoria estaban disminuidos en los pacientes P27, P28 y P29 y eran normales en el paciente P26 cuando se realizó un *Western-blot* utilizando un anticuerpo contra la subunidad OXPHOS, NDUFS3 (figura 37). De acuerdo con esto, el ensayo de actividad en gel (IGA) del complejo I mostraba una disminución en la actividad enzimática en los pacientes P27, P28 y P29. Los niveles del complejo IV estaban disminuidos en el paciente P28 y eran normales en el resto de pacientes, cuando se realizó un *Western-blot* utilizando un anticuerpo contra la subunidad OXPHOS, COX5A (figura 37). Sin embargo, el ensayo de actividad en gel (IGA) del complejo IV mostraba un déficit en las actividades enzimáticas de los pacientes P28 y P29, sugiriendo un defecto en la funcionalidad del complejo, aunque no en su ensamblaje en el paciente P29 (figura 37, panel 5). Se utilizó un anticuerpo contra la subunidad *sdhA* del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial como control de carga.

Como resumen, en este grupo de pacientes se observan 3 fenotipos de ensamblaje distintos: 1) fallo de ensamblaje único en el complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial, como es el caso del paciente P26; 2) fallos de ensamblaje combinados de los complejos III y I, como es el caso de los pacientes P27 y P29 y 3) fallos de ensamblaje combinados de los complejos I, III y IV, como presentaba el paciente P28. Sin embargo, los datos de ensamblaje no correlacionan con el análisis enzimático espectrofotométrico en los fibroblastos de estos pacientes, puesto que en este tejido mostraban niveles de las actividades enzimáticas de los complejos I, III y IV comparables a los controles.

Paciente	Género	Inicio de síntomas	Origen genético	% Act. CIII en músculo	% Act. CI en músculo	% Act. CIV en músculo	Fenotipos clínicos
P25	Mujer	6 años	NC	66	normal	95	Encefalomiopatía, antecedentes familiares rama materna.
P26	Mujer	2 años	NC	64	normal	47	PM, encefalopatía con retraso psicomotor, ptosis, cromosomopatía (CRI8 en anillo), hipotiroidismo, rasgos dismórficos, sinusitis y bronquitis.
P27	Mujer	1 año	NC	37	normal	normal	Encefalopatía, retraso mental, síndrome de Lennox-Gastaut, anomalías de comportamiento, atrofia muscular.
P28	Mujer	RN	NC	56	normal	normal	Insuficiencia hepática, colestasis, AL, hipoglucemia, depleción mitocondrial en hígado.
P29	Mujer	9 meses	NC	72	normal	normal	Miocardiopatía dilatada aguda, miopatía, anemia, polidactilia hereditaria

Tabla 9. Las actividades enzimáticas (Act.) fueron medidas por duplicado en al menos dos muestras independientes derivadas del paciente. Los valores para las actividades residuales de los complejos I (CI), III (CIII) y IV (CIV) en homogenado muscular son dados como porcentaje del valor del control más bajo (100%) después de la normalización con la enzima de matriz mitocondrial citrato sintasa. Las actividades del resto de complejos fueron normales. AL, acidosis láctica; CR, cromosoma; PM, proliferación mitocondrial; RN, recién nacido; NC, no conocido.

Paciente	Act. CIII en fibroblastos	Act. CI en fibroblastos	Act. CIV en fibroblastos	Defecto de Ensamblaje en fibroblastos
P25	1661	481	757	no
P26	1795	551	845	CIII
P27	1623	160 (61%)	879	CI+CIII
P28	3139	650	854	CI+CIII+CIV
P29	1884	509	862	CI+CIII
Rango Control	1270-2620	261-1051	680-1190	no

Tabla 10. Las actividades enzimáticas (Act.) de estos pacientes fueron medidas en el laboratorio del Dr. Smeitink (Nijmegen, Holanda). Los valores para las actividades residuales de los complejos I (CI), III (CIII) y IV (CIV) en fibroblastos son dados como mUJ citrato sintasa (CS). Las actividades del resto de complejos fueron normales. Los valores anormales, fuera del rango control, se marcan en rojo.

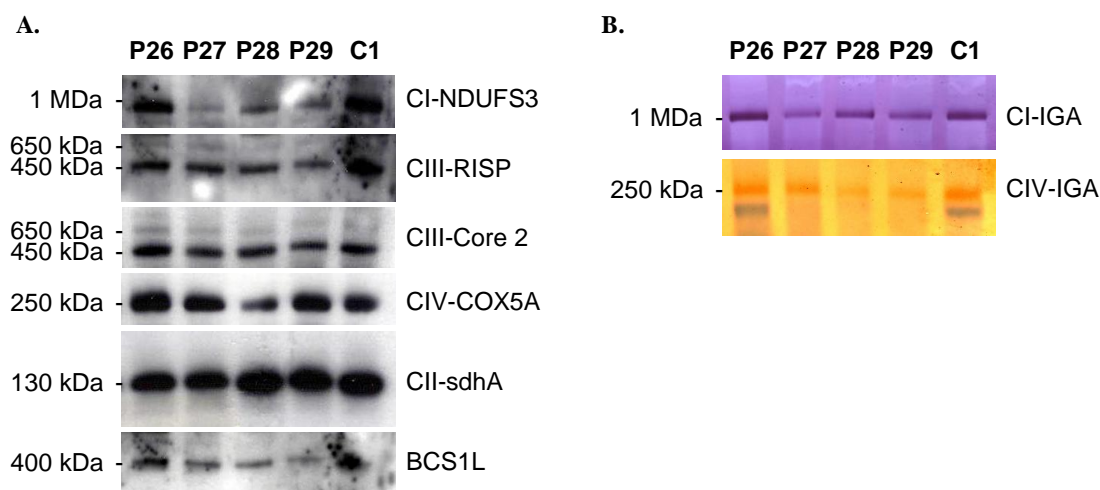


Figura 37. A. Análisis de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial mediante BN-PAGE realizado en fibroblastos de los pacientes P26-P29. La separación de los complejos multiproteicos fue analizada con 30 μ g de mitocondria aislada con digitonina en un gradiente del 4-15% de acrilamida/bisacrilamida. Para el análisis por *Western-blot* se incubaron anticuerpos contra las siguientes subunidades OXPHOS: NDUFS3 (complejo I, CI), Rieske hierro-azufre (RISP) y Core 2 del complejo III (CIII), COX5A (complejo IV, CIV) y sdhA (Complejo II, CII). La señal obtenida con un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína BCS1L se muestra en el panel inferior. La señal que corresponde al supercomplejo III₂+IV (~650 kDa) se indica en los paneles segundo y tercero. **B.** Estos gels se hicieron por duplicado para los ensayos de actividad en gel (IGAs) del complejo I (panel superior) y del complejo IV (panel inferior).

DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO 3

Se ha propuesto que existen dos tipos de mutaciones que dan lugar a un déficit enzimático del complejo III: 1) Las mutaciones que no van asociadas a defectos de ensamblaje. En este caso, se trata de mutaciones que producen defectos puramente catalíticos, conduciendo a un déficit aislado del complejo III y 2) mutaciones que van asociadas a defectos de ensamblaje en el complejo III. Estos defectos evitarían la formación de los supercomplejos mitocondriales, dando lugar a déficits enzimáticos combinados. En el caso de pacientes donde el déficit enzimático del complejo III ha sido asociado a defectos de ensamblaje de dicho complejo, se ha propuesto que los defectos de ensamblaje del complejo III conducen a una pérdida secundaria del complejo I de la cadena respiratoria, lo que se presentaría como un déficit combinado de los complejos III y I en humanos (Schägger, 2002; Schägger *et al.*, 2004; Acín-Pérez *et al.*, 2004). Se realizaron ensayos de ensamblaje de los complejos del sistema OXPHOS en muestras de pacientes con déficit enzimático primario del complejo III, con 2 objetivos: El primer objetivo consistió en verificar esta hipótesis. Para ello se realizó un estudio retrospectivo sobre homogenados musculares y/o fibroblastos de pacientes, disponibles en nuestro laboratorio. El segundo objetivo de esta estrategia experimental era tratar de mejorar el conocimiento sobre la

biogénesis del respirasoma humano y facilitar nuevas herramientas para el diagnóstico de las patologías mitocondriales.

Se comenzó analizando el ensamblaje o estabilidad de los complejos del sistema OXPHOS en homogenados musculares procedentes de 13 pacientes con un déficit enzimático aislado del complejo III. Si la hipótesis de partida es correcta, en principio no deberían encontrarse fallos de ensamblaje del complejo III o de ningún otro complejo de la cadena respiratoria en este grupo de pacientes. Sin embargo, acorde con nuestros resultados se han encontrado 6 fenotipos de ensamblaje distintos: i) fallos de ensamblaje o estabilidad del complejo III aislado, como son los casos de los pacientes P12 y P15, que presentaban miopatía. Además, el paciente P12, de 15 años, presentaba anorexia nerviosa y el paciente P15, de 70 años de edad, presentaba ptosis, debilidad muscular y tenía los niveles de actividad enzimática del complejo I en el límite de la normalidad. Estos 2 casos llaman la atención, puesto que en estudios previos en 100 pacientes con enfermedades neuromusculares, no consiguieron encontrar ningún caso con un defecto único de ensamblaje del complejo III (Schägger, 2004). En dicho estudio encontraron sólo dos casos con un defecto de ensamblaje combinado de los complejos III y I, en 2 pacientes con un déficit enzimático aislado del complejo III y que presentaban niveles enzimáticos del complejo I en el límite de la normalidad. Los autores llegaron a la conclusión de que un defecto de ensamblaje en el complejo III siempre iba asociado como mínimo a defectos de ensamblaje del complejo I; ii) de acuerdo con esos datos encontramos fallos de ensamblaje combinados de los complejos III y I en uno de nuestros pacientes, el paciente P9, de 59 años, que presentaba miopatía; iii) pero además, encontramos fallos de ensamblaje combinados de los complejos III y IV, como es el caso del paciente P18. Este paciente de 2 meses de edad presentaba encefalopatía y otros síntomas compatibles con un síndrome de Leigh; iv) asimismo, se detectaron fallos de ensamblaje combinados de los complejos I, III y IV, en tres pacientes (P10, P11 y P17). La única característica clínica común en estos pacientes, con un rango de edad que oscila desde recién nacido hasta los 55 años, es que presentaban encefalopatía. En el caso del paciente P10 existía además una disminución en los niveles del complejo II, lo que apunta a una posible degradación de la muestra; v) sorprendentemente, se encontraron fallos únicos del complejo I, como presentaba el paciente P16, con distribución anómala de la grasa subcutánea, retraso psicomotor y fallos musculares en general. No se puede descartar que este paciente porte mutaciones en alguna subunidad del complejo I, ya que se han observado déficits combinados de los complejos I y III asociados a mutaciones en el gen nuclear *NDUFS4* del complejo I (Budde *et al.*, 2000). De igual manera, se había encontrado un defecto único de ensamblaje del complejo I en el paciente P5 que portaba mutaciones en el gen *BCS1L* como hemos comentado en el capítulo 2 (apartado 2.4). Una posible explicación de que no haya un déficit enzimático del complejo I en los casos donde existe un defecto de ensamblaje de dicho complejo, sería que los bajos niveles del complejo I ensamblados fueran suficientes para mantener una actividad

enzimática normal del complejo, como se ha observado previamente (Schägger *et al.*, 2004); y vi) no existen fallos de ensamblaje en ninguno de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, como es el caso de 5 pacientes (P7, P8, P13, P14 y P19), tal y como se espera de la hipótesis. No se ha detectado una correlación entre el fenotipo de ensamblaje y los hallazgos clínicos de estos 5 pacientes, puesto que presentaban cuadros clínicos dispares, que oscilan desde ptosis fluctuante en el paciente P19 hasta encefalopatía combinada con otros síntomas en los pacientes P13 y P14. En estos casos, el déficit enzimático del complejo III podría deberse a mutaciones que afecten a sitios catalíticos en las subunidades de RISP y CYC1, puesto que se han descartado mutaciones en CYTB, y que no afectaran al ensamblaje del complejo III y, por ende, de los respirasomas.

Además, los niveles del complejo BCS1L de 10 de los 13 pacientes analizados eran comparables a los niveles control, salvo en los casos de los pacientes P11 y P15, en los que dichos niveles se encontraron disminuidos. El paciente P11, de 55 años de edad, presentaba acidosis láctica y encefalopatía, dos características comunes con los casos de déficit del complejo III causado por mutaciones en *BCS1L* (de Lonlay *et al.*, 2001; De Meirleir *et al.*, 2003; Fernández-Vizarra *et al.*, 2007). Por tanto, sería un candidato para la secuenciación de este gen, aunque llama la atención la edad tan avanzada del paciente. El paciente P15, de 70 años de edad, no presenta ningún síntoma clínico de los síndromes provocados por mutaciones en *BCS1L*. Cabe destacar que, a diferencia de lo que ocurre en nuestros experimentos, anteriormente no se había detectado la proteína BCS1L en homogenado muscular de pacientes con déficit del complejo III (Fernández-Vizarra *et al.*, 2007).

Estos resultados sugieren que el déficit enzimático aislado del complejo III en músculo, puede ir asociado a defectos de ensamblaje del complejo III de manera aislada o combinada con los complejos IV y/o I. Estos fallos de ensamblaje no necesariamente se traducen en una disminución de la actividad enzimática de dichos complejos. Asimismo, se identificó un paciente con déficit enzimático aislado del complejo III que únicamente presentó un defecto de ensamblaje del complejo I, y se observó un grupo de pacientes que no tiene defectos en el ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

Seguidamente se analizó el ensamblaje o estabilidad de los complejos del sistema OXPHOS en homogenado muscular de 5 pacientes con un déficit enzimático combinado de los complejos III y I. Si la hipótesis inicial era correcta, se esperaban fallos de ensamblaje del complejo III asociados a un fallo de ensamblaje del complejo I en este grupo de pacientes. Sin embargo, se han observado 3 fenotipos de ensamblaje distintos: i) un paciente (P20) presentaba un leve defecto único de ensamblaje del complejo I, que como comentábamos anteriormente, podría deberse a mutaciones en alguna subunidad del complejo I; ii) otro paciente (P21) presentaba un defecto de ensamblaje combinado de los complejos I, III y IV en músculo, junto con una ligera disminución del complejo II, lo que podría indicar que la muestra está degradada y iii) por

último, 3 pacientes (P22, P23 y P24) no presentaban defectos en la estabilidad o ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.

Estos resultados sugieren que los déficits enzimáticos combinados de los complejos III y I, no necesariamente tienen que ir asociados a un defecto en el ensamblaje del complejo III en músculo de pacientes (P22-P24). Posiblemente, en dicho caso las mutaciones responsables estén afectando a algún sitio catalítico de los complejos III ó I, o bien conducir a un déficit de CoQ₁₀ (ubiquinona) responsable del paso electrónico a dichos complejos. Este podría ser el caso del paciente P23, deficiente en CoQ₁₀ (tabla 8). Sin embargo, los fallos de ensamblaje del complejo III también pueden ir asociados a defectos de ensamblaje de los complejos I y IV (P21) ó pueden existir defectos únicos de ensamblaje del complejo I (P20), como se veía en un paciente (P9) con déficit enzimático aislado del complejo III. Los fallos de ensamblaje no correlacionan con los niveles de actividad enzimática ni con las características clínicas de los pacientes, puesto que los pacientes P23 y P24, que no presentaban defectos en el ensamblaje ocurría la clínica más severa y fallecieron a lo largo de la enfermedad.

Se quiso verificar si los datos de músculo eran coherentes con los datos de fibroblastos, puesto que los experimentos son más fácilmente reproducibles en este tejido. En músculo, el estado de conservación de las muestras sufre más variabilidad que en fibroblastos, lo que es crucial a la hora de realizar medidas de las actividades enzimáticas y estudios de ensamblaje. Se realizaron ensayos de *blue native* para el estudio del ensamblaje o estabilidad de los complejos del sistema OXPHOS en fibroblastos de 3 pacientes. Dos de estos pacientes mostraban déficit combinado de los complejos III y IV en fibroblastos (P10 y P18). El tercer paciente (P25) no mostraba alteraciones en las actividades enzimáticas mitocondriales en fibroblastos. Se han observado 3 fenotipos de ensamblaje distintos: i) fallos de ensamblaje combinados de los complejos III y IV en el paciente P10; ii) fallos de ensamblaje combinados de los complejos I, III y IV, en el paciente P18 y iii) no existen fallos de ensamblaje en ninguno de los complejos de la cadena respiratoria (P25). Estos 3 pacientes no presentaban defectos de ensamblaje del complejo BCS1L y los 3 presentaban antecedentes familiares en la rama materna. El paciente P10, con inicio de síntomas desde el nacimiento y que presentaba acidosis láctica, encefalopatía y mioclonía, tenía un déficit aislado del complejo III en músculo y presentaba defectos de ensamblaje de todos los complejos de la cadena respiratoria en dicho tejido, posiblemente asociado a una degradación parcial de la muestra. Sin embargo, este paciente presentaba en fibroblastos un déficit enzimático de los complejos III y IV (tabla 2, apartado 1.1.1.2), asociado a un defecto de ensamblaje de ambos complejos. El paciente P18, con inicio de síntomas a los 2 meses de edad, presentaba encefalopatía junto con otros síntomas compatibles de un síndrome de Leigh. Este paciente tenía un déficit aislado del complejo III en músculo y presentaba defectos de ensamblaje de los complejos III y IV en dicho tejido. Sin embargo, en fibroblastos presentaba un déficit enzimático de los complejos III y IV, asociado a un defecto de ensamblaje

de los complejos I, III y IV. Además, este paciente presentó un déficit enzimático del complejo I en el ensayo IGA que no fue detectado espectrofotométricamente y que correlaciona con el defecto de ensamblaje detectado en dicho complejo. Como se comentó en el capítulo anterior, esto podría deberse a las dificultades derivadas de medir, espectrofotométricamente, la actividad enzimática del complejo I en fibroblastos (Kirby *et al.*, 2007). El paciente P25, de 6 años de edad, presentaba encefalomiopatía. Este paciente tenía un déficit combinado de los complejos III y IV en músculo. Sin embargo, en fibroblastos no presentaba ningún déficit enzimático de los complejos OXPHOS y, consecuentemente, no presentaba defectos de ensamblaje. No sabemos que ocurre con el ensamblaje de los distintos complejos de la cadena respiratoria en músculo procedente de este paciente, por falta de disponibilidad de muestra. Estos resultados indican que en los fibroblastos de estos pacientes, los defectos de ensamblaje de los complejos OXPHOS parecen correlacionar con los déficits de las actividades enzimáticas de dichos complejos. Sin embargo, los fibroblastos del paciente P25 presentaban un déficit enzimático del complejo IV, en el ensayo IGA, que no correlacionaba con un defecto de ensamblaje de dicho complejo. Esto sugiere un defecto del complejo IV puramente catalítico en dicho paciente.

El estudio del ensamblaje de los distintos complejos de la cadena respiratoria, se completó en fibroblastos procedentes de 4 pacientes de los que no se disponía de homogenado muscular para el ensayo (P26-P29). El paciente 26 presentaba un déficit enzimático combinado de los complejos III y IV en músculo y una actividad normal de los distintos complejos de la cadena respiratoria en fibroblastos, cursando con una encefalopatía. El paciente P27, con un déficit aislado del complejo III en músculo y un déficit aislado del complejo I en fibroblastos, presentaba encefalopatía. Los pacientes P28 y P29, con un déficit aislado de la actividad enzimática del complejo III en músculo y una actividad normal de dicho complejo en fibroblastos, presentaban hepatopatía y miocardiopatía, respectivamente. En el caso de estos 2 pacientes, las medidas de las actividades enzimáticas espectrofotométricas en fibroblastos, no correlacionaban con la de los IGAs, puesto que ambos pacientes presentaban un déficit de las actividades enzimáticas de los complejos I y IV en estos últimos ensayos. En estos 4 pacientes se observaron 3 fenotipos de ensamblaje distintos: i) fallos de ensamblaje combinados de los complejos III y I, en el caso de los pacientes P27 y P29; ii) fallos de ensamblaje combinados de los complejos I, III y IV, como presentaba el paciente P28 y iii) no existen fallos de ensamblaje en ninguno de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, como es el caso del paciente P26. Estos resultados nos sugieren, que los defectos catalíticos producidos por fallos de ensamblaje del sistema OXPHOS son menos agresivos, en general, en fibroblastos que en músculo. Los resultados de los IGAs y de ensamblaje no correlacionan con las medidas de actividades espectrofotométricas en estos pacientes, por lo que se hace necesaria la repetición de dichas medidas.

Como conclusión general, se puede confirmar que existen dos tipos de déficits enzimáticos del complejo III, los puramente catalíticos y los que van asociados a defectos de ensamblaje. Sin embargo, en nuestros pacientes con déficit primario del complejo III la hipótesis de partida no parece cumplirse. Por un lado, el déficit enzimático aislado del complejo III puede ir asociado a fallos de ensamblaje de uno o más complejos OXPHOS. Por otro lado, el déficit enzimático combinado de los complejos III y I, no va necesariamente asociado a fallos de ensamblaje de dichos complejos. Incluso existen pacientes con déficit combinado de estos complejos que no presentan fallos de ensamblaje de ninguno de los complejos OXPHOS. Esto mismo ocurriría en el déficit enzimático combinado de los complejos III y IV, que no van necesariamente asociados a fallos de ensamblaje de dichos complejos en tejidos humanos. No parecen existir patrones definidos de defectos de ensamblaje que se puedan asociar a un déficit enzimático del complejo III. Por tanto, podemos concluir que la técnica de *blue native*, que sirve para estudiar el ensamblaje de los distintos complejos, no es de utilidad para realizar el diagnóstico de déficits enzimáticos del complejo III, corroborando observaciones previas (Schägger *et al.*, 2004).

Conclusiones

1. La nueva variación genética m.15533A>G encontrada en el gen mitocondrial *CYTB*, en un paciente con un déficit enzimático aislado del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial, se trata de un “polimorfismo raro” sin efecto patogénico claro.
2. Se han detectado 3 nuevas mutaciones patogénicas en el gen *BCS1L*, en pacientes que presentaban un déficit enzimático primario del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial. Las dos nuevas mutaciones en el paciente P4: g.1181A>G y g.1164C>G, dan lugar a una caída de los niveles de los ARNm de *BCS1L* intracelulares. La mutación c.148A>G (p.T50A) en el paciente P6, produce una disminución de los niveles del factor de ensamblaje BCS1L en la mitocondria, afectando a la incorporación de la proteína hierro-azufre de Rieske (RISP) en el complejo III.
3. En un grupo de 6 pacientes en los que se han analizado las consecuencias fisiopatológicas de las mutaciones en el gen *BCS1L*, se ha demostrado que: i) no disminuyen los niveles de expresión de la proteína BCS1L, pero sí lo hacen los niveles de la subunidad RISP del complejo III a nivel celular; ii) existen fallos en la formación o estabilidad del complejo BCS1L en la mitocondria y, por tanto, del complejo III; y iii) el ensamblaje anormal de otros complejos de la cadena respiratoria depende de la mutación, pudiendo manifestarse un defecto único del complejo III o combinado con los complejos I y/o IV.
4. Las mutaciones detectadas en el gen *BCS1L*, en los pacientes P1-P4 con déficit de complejo III, son más deletéreas que las mutaciones descritas en los pacientes P5 y P6. Dichas mutaciones, además de producir defectos de ensamblaje del complejo III combinado con un defecto de ensamblaje de los complejos I y/o IV, provocan un aumento de los niveles de ROS, una activación general de las defensas antioxidantes, cambios en la morfología mitocondrial y una activación del mecanismo de muerte celular programada. Este grado de patogenicidad correlaciona con la gravedad de los síntomas clínicos de dichos pacientes.
5. Existe una gran variabilidad fenotípica de fallos de ensamblaje, tanto en homogenado muscular como en fibroblastos, entre diferentes pacientes. Por otro lado, existen diferentes patrones fenotípicos, tanto de los déficits enzimáticos de los complejos del sistema OXPHOS, como de los fallos de ensamblaje de dichos complejos, en diferentes tejidos procedentes de un mismo paciente.

6. En muestras biológicas procedentes de pacientes con déficit enzimático aislado del complejo III, pueden existir o no fallos de ensamblaje de uno o más complejos OXPHOS. Por tanto, no se cumple la hipótesis inicial de que los déficits enzimáticos aislados del complejo III nunca van asociados a defectos de ensamblaje de dicho complejo.
7. En muestras biológicas procedentes de pacientes con déficit enzimático combinado de los complejos III y I, o de los complejos III y IV, pueden no existir fallos de ensamblaje de ningún complejo del sistema OXPHOS.
8. Los ensayos realizados en geles bidimensionales *blue-native*, no son de utilidad para diagnosticar déficits enzimáticos del complejo III, puesto que no existe una correlación entre los fenotipos clínicos, las medidas de las actividades enzimáticas y los fenotipos de ensamblaje encontrados.

Bibliografía

- Acín-Pérez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernández-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Pérez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T., y Enríquez, J.A. (2004). Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell* 13, 805-815.
- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M.L., Pérez-Martos, A., y Enríquez, J.A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32, 529-539.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., y Young, I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.
- Andreu, A.L., Bruno, C., Dunne, T.C., Tanji, K., Shanske, S., Sue, C.M., Krishna, S., Hadjigeorgiou, G.M., Shtilbans, A., Bonilla, E., y DiMauro, S. (1999a). A nonsense mutation (G15059A) in the *cytochrome b* gene in a patient with exercise intolerance and myoglobinuria. *Ann Neurol* 45, 127-130.
- Andreu, A.L., Hanna, M.G., Reichmann, H., Bruno, C., Penn, A.S., Tanji, K., Pallotti, F., Iwata, S., Bonilla, E., Lach, B., Morgan-Hughes, J., y DiMauro, S. (1999b). Exercise intolerance due to mutations in the *cytochrome b* gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 341, 1037-1044.
- Andrews, R.M., Kubacka, I., Chinnery, P.F., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M., y Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23, 147.
- Arco, A.D., y Satrustegui, J. (2005). New mitochondrial carriers: an overview. *Cell Mol Life Sci* 62, 2204-2227.
- Attardi, G., y Schatz, G. (1988). Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 4, 289-333.
- Barel, O., Shorer, Z., Flusser, H., Ofir, R., Narkis, G., Finer, G., Shalev, H., Nasasra, A., Saada, A., y Birk, O.S. (2008). Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in *UQCRCQ*. *Am J Hum Genet* 82, 1211-1216.
- Baum, H., Silman, H.I., Rieske, H.S., y Lipton, S.H. (1967). On the composition and structural organization of complex 3 of the mitochondrial electron transfer chain. *J Biol Chem* 242, 4876-4887.

- Beckmann, J.D., Ljungdahl, P.O., Lopez, J.L., y Trumpower, B.L. (1987). Isolation and characterization of the nuclear gene encoding the Rieske iron-sulfur protein (RIP1) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 262, 8901-8909.
- Benard, G., y Rossignol, R. (2008). Ultrastructure of the mitochondrion and its bearing on function and bioenergetics. *Antioxid Redox Signal* 10, 1313-1342.
- Berden, J.A., Nieboer, P., y Hartog, A.F. (1988). Dissociation-reconstitution experiments with NBD-modified F1: support for the presence of two catalytic beta-subunits. *Prog Clin Biol Res* 273, 81-86.
- Bianchi, K., Rimessi, A., Prandini, A., Szabadkai, G., y Rizzuto, R. (2004). Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship. *Biochim Biophys Acta* 1742, 119-131.
- Blakely, E.L., Mitchell, A.L., Fisher, N., Meunier, B., Nijtmans, L.G., Schaefer, A.M., Jackson, M.J., Turnbull, D.M., y Taylor, R.W. (2005). A mitochondrial *cytochrome b* mutation causing severe respiratory chain enzyme deficiency in humans and yeast. *Febs J* 272, 3583-3592.
- Blázquez, A., Gil-Borlado, M.C., Morán, M., Verdú, A., Cazorla-Calleja, M.R., Martín, M.A., Arenas, J., y Ugalde, C. (2009). Infantile mitochondrial encephalomyopathy with unusual phenotype caused by a novel *BCS1L* mutation in an isolated complex III-deficient patient. *Neuromuscul Disord* 19, 143-146.
- Boekema, E.J., y Braun, H.P. (2007). Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem* 282, 1-4.
- Bogenhagen, D.F., Wang, Y., Shen, E.L., y Kobayashi, R. (2003). Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Mol Cell Proteomics* 2, 1205-1216.
- Boguski, M.S., Lowe, T.M., y Tolstoshev, C.M. (1993). dbEST-database for "expressed sequence tags". *Nat Genet* 4, 332-333.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P., y Lipton, S.A. (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7162-7166.

- Borisov, V.B. (2002). Defects in mitochondrial respiratory complexes III and IV, and human pathologies. *Mol Aspects Med* 23, 385-412.
- Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Pequignot, E., Munnich, A., y Rotig, A. (1995). Mutation of a nuclear *succinate dehydrogenase* gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* 11, 144-149.
- Bousquet, I., Dujardin, G., y Slonimski, P.P. (1991). *ABC1*, a novel yeast nuclear gene has a dual function in mitochondria: it suppresses a *cytochrome b* mRNA translation defect and is essential for the electron transfer in the *bc1* complex. *Embo J* 10, 2023-2031.
- Bowmaker, M., Yang, M.Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Jacobs, H.T., Huberman, J.A., y Holt, I.J. (2003). Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem* 278, 50961-50969.
- Brand, M.D., y Esteves, T.C. (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab* 2, 85-93.
- Brandt, U., Uribe, S., Schagger, H., y Trumpower, B.L. (1994). Isolation and characterization of *QCR10*, the nuclear gene encoding the 8.5-kDa subunit 10 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *bc1* complex. *J Biol Chem* 269, 12947-12953.
- Brasseur, G., Tron, G., Dujardin, G., Slonimski, P.P., y Brivet-Chevillotte, P. (1997). The nuclear *ABC1* gene is essential for the correct conformation and functioning of the cytochrome *bc1* complex and the neighbouring complexes II and IV in the mitochondrial respiratory chain. *Eur J Biochem* 246, 103-111.
- Bruel, C., Brasseur, R., y Trumpower, B.L. (1996). Subunit 8 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *bc1* complex interacts with succinate-ubiquinone reductase complex. *J Bioenerg Biomembr* 28, 59-68.
- Budde, S.M., Van den Heuvel, L.P., Janssen, A.J., Smeets, R.J., Buskens, C.A., DeMeirleir, L., Van Coster, R., Baethmann, M., Voit, T., Trijbels, J.M., Smeitink, J.A. (2000). Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded *NDUFS4* gene. *Biochem Biophys Res Commun* 275 (1), 63-68.

- Burgoyne, L.A., Hewish, D.R., y Mobbs, J. (1974). Mammalian chromatin substructure studies with the calcium-magnesium endonuclease and two-dimensional polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem J* 143, 67-72.
- Calvo, S., Jain, M., Xie, X., Sheth, S.A., Chang, B., Goldberger, O.A., Spinazzola, A., Zeviani, M., Carr, S.A., y Mootha, V.K. (2006). Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nat Genet* 38, 576-582.
- Cannon, B., y Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84, 277-359.
- Cao, L., Shitara, H., Horii, T., Nagao, Y., Imai, H., Abe, K., Hara, T., Hayashi, J., y Yonekawa, H. (2007). The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nat Genet* 39, 386-390.
- Cardazzo, B., Hamel, P., Sakamoto, W., Wintz, H., y Dujardin, G. (1998). Isolation of an *Arabidopsis thaliana* cDNA by complementation of a yeast *abc1* deletion mutant deficient in complex III respiratory activity. *Gene* 221, 117-125.
- Cervený, K.L., Tamura, Y., Zhang, Z., Jensen, R.E., y Sesaki, H. (2007). Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends Cell Biol* 17, 563-569.
- Clayton, D.A. (1982). Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28, 693-705.
- Clayton, D.A. (1992). Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int Rev Cytol* 141, 217-232.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., y Deleage, G. (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* 25, 147-150.
- Cormier, V., Rotig, A., Tardieu, M., Colonna, M., Saudubray, J.M., y Munnich, A. (1991). Autosomal dominant deletions of the mitochondrial genome in a case of progressive encephalomyopathy. *Am J Hum Genet* 48, 643-648.
- Cree, L.M., Samuels, D.C., de Sousa Lopes, S.C., Rajasimha, H.K., Wonnapijit, P., Mann, J.R., Dahl, H.H., y Chinnery, P.F. (2008). A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat Genet* 40, 249-254.

- Crivellone, M.D. (1994). Characterization of *CBP4*, a new gene essential for the expression of ubiquinol-cytochrome *c* reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269, 21284-21292.
- Crivellone, M.D., Wu, M.A., y Tzagoloff, A. (1988). Assembly of the mitochondrial membrane system. Analysis of structural mutants of the yeast coenzyme QH₂-cytochrome *c* reductase complex. *J Biol Chem* 263, 14323-14333.
- Cruciat, C.M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W., y Stuart, R.A. (2000). The cytochrome *bc*₁ and cytochrome *c* oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J Biol Chem* 275, 18093-18098.
- Cruciat, C.M., Hell, K., Folsch, H., Neupert, W., y Stuart, R.A. (1999). Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome *bc*(1) complex. *Embo J* 18, 5226-5233.
- Culbertson, M.R. (1999). RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends Genet* 15, 74-80.
- Chan, D.C. (2006). Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125, 1241-1252.
- Chen, H., y Chan, D.C. (2005). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2, R283-289.
- D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Lenaz, G., y Manfredi, G. (2006). Respiratory chain supercomplexes set the threshold for respiration defects in human mtDNA mutant cybrids. *Hum Mol Genet* 15, 2157-2169.
- D'Aurelio, M., Gajewski, C.D., Lin, M.T., Mauck, W.M., Shao, L.Z., Lenaz, G., Moraes, C.T., y Manfredi, G. (2004). Heterologous mitochondrial DNA recombination in human cells. *Hum Mol Genet* 13, 3171-3179.
- de Brito, O.M., y Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605-610.

de Lonlay, P., Valnot, I., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Tzagoloff, A., Taanman, J.W., Benayoun, E., Chretien, D., Kadhon, N., Lombes, A., de Baulny, H.O., Niaudet, P., Munnich, A., Rustin, P., y Rotig, A. (2001). A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet* 29, 57-60.

De Meirleir, L., Seneca, S., Damis, E., Sepulchre, B., Hoorens, A., Gerlo, E., Garcia Silva, M.T., Hernandez, E.M., Lissens, W., y Van Coster, R. (2003). Clinical and diagnostic characteristics of complex III deficiency due to mutations in the *BCS1L* gene. *Am J Med Genet A* 121A, 126-131.

Díaz, F., Fukui, H., García, S., y Moraes, C.T. (2006). Cytochrome *c* oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* 26, 4872-4881.

Dimauro, S. (2004). Mitochondrial medicine. *Biochim Biophys Acta* 1659, 107-114.

DiMauro, S., Bonilla, E., Zeviani, M., Servidei, S., DeVivo, D.C., y Schon, E.A. (1987). Mitochondrial myopathies. *J Inherit Metab Dis* 10 Suppl 1, 113-128.

DiMauro, S., Hirano, M., y Schon, E.A. (2006). Approaches to the treatment of mitochondrial diseases. *Muscle Nerve* 34, 265-283.

DiMauro, S., y Schon, E.A. (2008). Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 31, 91-123.

Do, T.Q., Hsu, A.Y., Jonassen, T., Lee, P.T., y Clarke, C.F. (2001). A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae abc1* mutants. *J Biol Chem* 276, 18161-18168.

Dudkina, N.V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E.J., y Braun, H.P. (2005). Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3225-3229.

Duke, R.C., y Cohen, J.J. (1986). IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Res* 5, 289-299.

- Dunbar, D.R., Moonie, P.A., Jacobs, H.T., y Holt, I.J. (1995). Different cellular backgrounds confer a marked advantage to either mutant or wild-type mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6562-6566.
- Ellis, R.J., y Van der Vries, S.M. (2001). Molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* 60, 321-347.
- Eubel, H., Heinemeyer, J., y Braun, H.P. (2004a). Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. *Plant Physiol* 134, 1450-1459.
- Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., y Braun, H.P. (2004b). Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiol Biochem* 42, 937-942.
- Fellman, V. (2002). The GRACILE syndrome, a neonatal lethal metabolic disorder with iron overload. *Blood Cells Mol Dis* 29, 444-450.
- Fellman, V., Rapola, J., Pihko, H., Varilo, T., y Raivio, K.O. (1998). Iron-overload disease in infants involving fetal growth retardation, lactic acidosis, liver haemosiderosis, and aminoaciduria. *Lancet* 351, 490-493.
- Fernández-Vizarra, E., Bugiani, M., Goffrini, P., Carrara, F., Farina, L., Procopio, E., Donati, A., Uziel, G., Ferrero, I., y Zeviani, M. (2007). Impaired complex III assembly associated with *BCS1L* gene mutations in isolated mitochondrial encephalopathy. *Hum Mol Genet* 16, 1241-1252.
- Fernández-Vizarra, E., Tiranti, V., y Zeviani, M. (2009). Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: What we have learned by studying its defects. *Biochim Biophys Acta* 1793, 200-211.
- Filosto, M., Mancuso, M., Vives-Bauza, C., Vila, M.R., Shanske, S., Hirano, M., Andreu, A.L., y DiMauro, S. (2003). Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 54, 524-526.
- Fölsch, H., Guiard, B., Neupert, W., y Stuart, R.A. (1996). Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. *Embo J* 15, 479-487.

- Frazier, A.E., Taylor, R.D., Mick, D.U., Warscheid, B., Stoepel, N., Meyer, H.E., Ryan, M.T., Guiard, B., y Rehling, P. (2006). Mdm38 interacts with ribosomes and is a component of the mitochondrial protein export machinery. *J Cell Biol* 172, 553-564.
- Fuku, N., Oshida, Y., Takeyasu, T., Guo, L.J., Kurata, M., Yamada, Y., Sato, Y., y Tanaka, M. (2002). Mitochondrial ATPase subunit 6 and *cytochrome b* gene polymorphisms in young obese adults. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 1199-1205.
- Fukui, H., y Moraes, C.T. (2008). The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? *Trends Neurosci* 31, 251-256.
- Gabaldón, T., y Huynen, M.A. (2003). Reconstruction of the proto-mitochondrial metabolism. *Science* 301, 609.
- Gampel, A., Nishikimi, M., y Tzagoloff, A. (1989). CBP2 protein promotes in vitro excision of a yeast mitochondrial group I intron. *Mol Cell Biol* 9, 5424-5433.
- Garesse, R., y Vallejo, C.G. (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* 263, 1-16.
- Gil-Borlado, M.C., González-Hoyuela, M., Blázquez, A., García-Silva, M.T., Gabaldón, T., Manzanares, J., Vara, J., Martín, M.A., Seneca, S., Arenas, J. y Ugalde, C. (2009). Pathogenic mutations in the 5' untranslated region of *BCS1L* mRNA in mitochondrial complex III deficiency. *Mitochondrion* (xxx).
- Graham, L.A., Phillips, J.D., y Trumpower, B.L. (1992). Deletion of subunit 9 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *bc1* complex specifically impairs electron transfer at the ubiquinol oxidase site (center P) in the *bc1* complex. *FEBS Lett* 313, 251-254.
- Green, D.R. (2005). Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121, 671-674.
- Grivell, L.A. (1989). Nucleo-mitochondrial interactions in yeast mitochondrial biogenesis. *Eur J Biochem* 182, 477-493.

- Guillery, O., Malka, F., Frachon, P., Milea, D., Rojo, M., y Lombes, A. (2008). Modulation of mitochondrial morphology by bioenergetics defects in primary human fibroblasts. *Neuromuscul Disord* 18, 319-330.
- Hauswirth, W.W., y Laipis, P.J. (1982). Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 4686-4690.
- Haut, S., Brivet, M., Touati, G., Rustin, P., Lebon, S., Garcia-Cazorla, A., Saudubray, J.M., Boutron, A., Legrand, A., y Slama, A. (2003). A deletion in the human *QP-C* gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis. *Hum Genet* 113, 118-122.
- Heinemeyer, J., Braun, H.P., Boekema, E.J., y Kouril, R. (2007). A structural model of the cytochrome *c* reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *J Biol Chem* 282, 12240-12248.
- Hinson, J.T., Fantin, V.R., Schonberger, J., Breivik, N., Siem, G., McDonough, B., Sharma, P., Keogh, I., Godinho, R., Santos, F., Esparza, A., Nicolau, Y., Selvaag, E., Cohen, B.H., Hoppel, C.L., Tranebjaerg, L., Eavey, R.D., Seidman, J.G., y Seidman, C.E. (2007). Missense mutations in the *BCS1L* gene as a cause of the Bjornstad syndrome. *N Engl J Med* 356, 809-819.
- Holt, I.J., Harding, A.E., y Morgan-Hughes, J.A. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331, 717-719.
- Holt, I.J., Lorimer, H.E., y Jacobs, H.T. (2000). Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* 100, 515-524.
- Horvarth, R., Gorman, G. y Chinnery, P.F. (2008). How can we treat mitochondrial encephalomyopathies? Approaches to therapy. *Neurotherapeutics* 4, 558-568.
- Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmanith, T., y Michel, H. (2000). Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome *bc*(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* 8, 669-684.
- Hunte, C., Palsdottir, H., y Trumpower, B.L. (2003). Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome *bc*1 complex. *FEBS Lett* 545, 39-46.

- Iizumi, M., Arakawa, H., Mori, T., Ando, A., y Nakamura, Y. (2002). Isolation of a novel gene, *CABC1*, encoding a mitochondrial protein that is highly homologous to yeast activity of *bc1* complex. *Cancer Res* 62, 1246-1250.
- Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., y Jap, B.K. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome *bc1* complex. *Science* 281, 64-71.
- Jenuth, J.P., Peterson, A.C., Fu, K., y Shoubridge, E.A. (1996). Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat Genet* 14, 146-151.
- Kasamatsu, H., y Vinograd, J. (1973). Unidirectionality of replication in mouse mitochondrial DNA. *Nat New Biol* 241, 103-105.
- Keightley, J.A., Anitori, R., Burton, M.D., Quan, F., Buist, N.R., y Kennaway, N.G. (2000). Mitochondrial encephalomyopathy and complex III deficiency associated with a stop-codon mutation in the *cytochrome b* gene. *Am J Hum Genet* 67, 1400-1410.
- King, M.P., y Attardi, G. (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246, 500-503.
- King, M.P., y Attardi, G. (1996). Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol* 264, 304-313.
- Kirby, D.M., Thorburn, D.R., Turnbull, D.M., y Taylor, R.W. (2007). Biochemical assays of respiratory chain complex activity. *Methods Cell Biol* 80, 93-119.
- Koopman, W.J., Verkaart, S., Visch, H.J., van Emst-de Vries, S., Nijtmans, L.G., Smeitink, J.A., y Willems, P.H. (2007). Human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency: radical changes in mitochondrial morphology? *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C22-29.
- Koopman, W.J., Visch, H.J., Verkaart, S., van den Heuvel, L.W., Smeitink, J.A., y Willems, P.H. (2005). Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity are tightly correlated in isolated human complex I deficiency. *Am J Physiol Cell Physiol* 289, C881-890.

- Kotarsky, H., Tabasum, I., Mannisto, S., Heikinheimo, M., Hansson, S., y Fellman, V. (2007). BCS1L is expressed in critical regions for neural development during ontogenesis in mice. *Gene Expr Patterns* 7, 266-273.
- Krause, F., Reifschneider, N.H., Vocke, D., Seelert, H., Rexroth, S., y Dencher, N.A. (2004). "Respirasome"-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach. *J Biol Chem* 279, 48369-48375.
- Kronekova, Z., y Rodel, G. (2005). Organization of assembly factors Cbp3p and Cbp4p and their effect on *bc(1)* complex assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 47, 203-212.
- Kurland, C.G., y Andersson, S.G. (2000). Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 786-820.
- Kwong, J.Q., Henning, M.S., Starkov, A.A., y Manfredi, G. (2007). The mitochondrial respiratory chain is a modulator of apoptosis. *J Cell Biol* 179, 1163-1177.
- Laipis, P.J., Van de Walle, M.J., y Hauswirth, W.W. (1988). Unequal partitioning of bovine mitochondrial genotypes among siblings. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 8107-8110.
- Lamantea, E., Carrara, F., Mariotti, C., Morandi, L., Tiranti, V., y Zeviani, M. (2002). A novel nonsense mutation (Q352X) in the mitochondrial *cytochrome b* gene associated with a combined deficiency of complexes I and III. *Neuromuscul Disord* 12, 49-52.
- Larsson, N.G., y Rustin, P. (2001). Animal models for respiratory chain disease. *Trends Mol Med* 7, 578-581.
- Lazarou, M., Thorburn, D.R., Ryan, M.T., y McKenzie, M. (2009). Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. *Biochim Biophys Acta* 1793, 78-88.
- Leary, S.C., Mattman, A., Wai, T., Koehn, D.C., Clarke, L.A., Chan, S., Lomax, B., Eydoux, P., Vallance, H.D., y Shoubridge, E.A. (2006). A hemizygous *SCO2* mutation in an early onset rapidly progressive, fatal cardiomyopathy. *Mol Genet Metab* 89, 129-133.
- Lee, S.Y., Raha, S., Nagar, B., y Robinson, B.H. (2001). The functional role of conserved acidic residues of the Qcr7 protein of the cytochrome *bc(1)* complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* 393, 207-214.

- Legros, F., Chatzoglou, E., Frachon, P., Ogier De Baulny, H., Laforet, P., Jardel, C., Godinot, C., y Lombes, A. (2001). Functional characterization of novel mutations in the human *cytochrome b* gene. *Eur J Hum Genet* 9, 510-518.
- Legros, F., Lombes, A., Frachon, P., y Rojo, M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 13, 4343-4354.
- Lenaz, G., y Genova, M.L. (2007). Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1221-1239.
- Li, Y., D'Aurelio, M., Deng, J.H., Park, J.S., Manfredi, G., Hu, P., Lu, J., y Bai, Y. (2007). An assembled complex IV maintains the stability and activity of complex I in mammalian mitochondria. *J Biol Chem* 282, 17557-17562.
- Ljungdahl, P.O., Pennoyer, J.D., Robertson, D.E., y Trumpower, B.L. (1987). Purification of highly active cytochrome bc₁ complexes from phylogenetically diverse species by a single chromatographic procedure. *Biochim Biophys Acta* 891, 227-241.
- Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombes, A., y Rojo, M. (2005). Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep* 6, 853-859.
- Man, P.Y., Griffiths, P.G., Brown, D.T., Howell, N., Turnbull, D.M., y Chinnery, P.F. (2003). The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet* 72, 333-339.
- Margulis, L. (1975). Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol*, 21-38.
- Martínez, B., del Hoyo, P., Martín, M.A., Arenas, J., Pérez-Castillo, A., Santos, A. (2001). Thyroid hormone regulates oxidative phosphorylation in the cerebral cortex and striatum of neonatal rats. *J. Neurochem.* 78, 1054-1063.
- Mathews, C.K., van Holde, K.E., y Ahern, K.-G. (2000). *Biochemistry*, 3rd Edition. Benjamin Cummings, San Francisco.

- Mitchell, P. (1976). Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J Theor Biol* 62, 327-367.
- Montoya, J., Gaines, G.L., y Attardi, G. (1983). The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell* 34, 151-159.
- Montoya, J., López-Gallardo, E., Díez-Sánchez, C., López-Pérez, M.J. y Ruiz-Pesini, E. (2008). 20 years of human mtDNA pathologic point mutations: Carefully reading the pathogenicity criteria. *Biochim Biophys Acta* (xxx).
- Morán, M., Delgado, J., Gonzalez, B., Manso, R., y Megías, A. (2004). Responses of rat myocardial antioxidant defences and heat shock protein HSP72 induced by 12 and 24-week treadmill training. *Acta Physiol Scand* 180, 157-166.
- Muhlenhoff, U., y Lill, R. (2000). Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1459, 370-382.
- Nass, M.M., y Nass, S. (1963). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining reactions. *J Cell Biol* 19, 593-611.
- Nijtmans, L.G., Henderson, N.S., y Holt, I.J. (2002). Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods* 26, 327-334.
- Nijtmans, L.G., Ugalde, C., Van den Heuvel, L.P., y Smeitink, J.A. (2004). Function and dysfunction of the oxidative phosphorylation system. In mitochondrial biogenesis (Koehler y Bauer, editors). In topics in Current Genetics. (Stefan Hohmann Series Editor). Springer verlag. Heidelberg, Germany.
- Nobrega, F.G., Nobrega, M.P., y Tzagoloff, A. (1992). *BCS1*, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 11, 3821-3829.
- Nobrega, F.G., y Tzagoloff, A. (1980). Assembly of the mitochondrial membrane system. DNA sequence and organization of the *cytochrome b* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 255, 9828-9837.

- Nowikovsky, K., Froschauer, E.M., Zsurka, G., Samaj, J., Reipert, S., Kolisek, M., Wiesenberger, G., y Schweyen, R.J. (2004). The *LETM1/YOL027* gene family encodes a factor of the mitochondrial K⁺ homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Biol Chem* 279, 30307-30315.
- Ogura, T., y Wilkinson, A.J. (2001). AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes Cells* 6, 575-597.
- Ojala, D., Montoya, J., y Attardi, G. (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290, 470-474.
- Olivo, P.D., Van de Walle, M.J., Laipis, P.J., y Hauswirth, W.W. (1983). Nucleotide sequence evidence for rapid genotypic shifts in the bovine mitochondrial DNA D-loop. *Nature* 306, 400-402.
- Pagliarini, D.J., Calvo, S.E., Chang, B., Sheth, S.A., Vafai, S.B., Ong, S.E., Walford, G.A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W.K., Hill, D.E., Vidal, M., Evans, J.G., Thorburn, D.R., Carr, S.A., y Mootha, V.K. (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134, 112-123.
- Pallotti, F., Baracca, A., Hernandez-Rosa, E., Walker, W.F., Solaini, G., Lenaz, G., Melzi D'Eril, G.V., Dimauro, S., Schon, E.A., y Davidson, M.M. (2004). Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harbouring mitochondrial DNA mutations. *Biochem J* 384, 287-293.
- Pello, R., Martin, M.A., Carelli, V., Nijtmans, L.G., Achilli, A., Pala, M., Torroni, A., Gomez-Duran, A., Ruiz-Pesini, E., Martinuzzi, A., Smeitink, J.A., Arenas, J., y Ugalde, C. (2008). Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Hum Mol Genet* 17, 4001-4011.
- Petruzzella, V., Tiranti, V., Fernandez, P., Ianna, P., Carrozzo, R., y Zeviani, M. (1998). Identification and characterization of human cDNAs specific to *BCS1*, *PET112*, *SCO1*, *COX15*, and *COX11*, five genes involved in the formation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Genomics* 54, 494-504.

- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., y Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605-1612.
- Pham, N.A., Richardson, T., Cameron, J., Chue, B., y Robinson, B.H. (2004). Altered mitochondrial structure and motion dynamics in living cells with energy metabolism defects revealed by real time microscope imaging. *Microsc Microanal* 10, 247-260.
- Phillips, J.D., Schmitt, M.E., Brown, T.A., Beckmann, J.D., y Trumpower, B.L. (1990). Isolation and characterization of *QCR9*, a nuclear gene encoding the 7.3-kDa subunit 9 of the *Saccharomyces cerevisiae* ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase complex. An intron-containing gene with a conserved sequence occurring in the intron of *COX4*. *J Biol Chem* 265, 20813-20821.
- Pillar, T., Lang, B.F., Steinberger, I., Vogt, B., y Kaudewitz, F. (1983). Expression of the "split gene" *cob* in yeast mtDNA. Nuclear mutations specifically block the excision of different introns from its primary transcript. *J Biol Chem* 258, 7954-7959.
- Rigoli, L., Di Bella, C., Verginelli, F., Falchetti, M., Bersiga, A., Rocco, A., Nardone, G., Mariani-Costantini, R. y Caruso, R.A. (2008). Histological heterogeneity and somatic mtDNA mutations in gastric intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol* 6, 733-741.
- Rödel, G. (1986). Two yeast nuclear genes, *CBS1* and *CBS2*, are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5'-untranslated *COB* leader. *Curr Genet* 11, 41-45.
- Rödel, G. (1997). Translational activator proteins required for cytochrome *b* synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 31, 375-379.
- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D., y Lombes, A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* 115, 1663-1674.
- Saint-Georges, Y., Garcia, M., Delaveau, T., Jourden, L., Le Crom, S., Lemoine, S., Tanty, V., Devaux, F., y Jacq, C. (2008). Yeast mitochondrial biogenesis: a role for the *PUF* RNA-binding protein Puf3p in mRNA localization. *PLoS ONE* 3, e2293.

- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schafer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A., y Vonck, J. (2006). Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 281, 15370-15375.
- Schägger, H. (2001). Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* 52, 119-128.
- Schägger, H. (2002). Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1555, 154-159.
- Schägger, H., de Coo, R., Bauer, M.F., Hofmann, S., Godinot, C., y Brandt, U. (2004). Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 279, 36349-36353.
- Schägger, H., y Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* 19, 1777-1783.
- Scheffler, I.E. (1999). Mitochondria. New York, John Wiley&Sons, Inc.
- Scheffler, I.E. (2001). Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliv Rev* 49, 3-26.
- Schlickum, S., Moghekar, A., Simpson, J.C., Steglich, C., O'Brien, R.J., Winterpacht, A., y Ende, S.U. (2004). *LETM1*, a gene deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome, encodes an evolutionarily conserved mitochondrial protein. *Genomics* 83, 254-261.
- Schon, E.A., y DiMauro, S. (2007). Mitochondrial mutations: genotype to phenotype. *Novartis Found Symp* 287, 214-225; discussion 226-233.
- Schoppink, P.J., Hemrika, W., Reynen, J.M., Grivell, L.A., y Berden, J.A. (1988). Yeast ubiquinol: cytochrome *c* oxidoreductase is still active after inactivation of the gene encoding the 17-kDa subunit VI. *Eur J Biochem* 173, 115-122.
- Schwartz, M., y Vissing, J. (2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 347, 576-580.

- Shi, G., Crivellone, M.D., y Edderkaoui, B. (2001). Identification of functional regions of Cbp3p, an enzyme-specific chaperone required for the assembly of ubiquinol-cytochrome *c* reductase in yeast mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1506, 103-116.
- Smeitink, J., van den Heuvel, L., y DiMauro, S. (2001). The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet* 2, 342-352.
- Smeitink, J.A., Zeviani, M., Turnbull, D.M., y Jacobs, H.T. (2006). Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders. *Cell Metab* 3, 9-13.
- Stach, R.W., Garian, N., y Olender, E.J. (1979). Biological activity of the beta nerve growth factor: the effects of various added proteins. *J Neurochem* 33, 257-261.
- Stan, T., Brix, J., Schneider-Mergener, J., Pfanner, N., Neupert, W., y Rapaport, D. (2003). Mitochondrial protein import: recognition of internal import signals of BCS1 by the TOM complex. *Mol Cell Biol* 23, 2239-2250.
- Strachan, T. y Read, A. (1999) *Human Molecular Genetics* 2. 2nd edition, Garland Science, New York and London.
- Suen, D.F., Norris, K.L., y Youle, R.J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* 22, 1577-1590.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., y Schatten, G. (2000). Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod* 63, 582-590.
- Tamai, S., Iida, H., Yokota, S., Sayano, T., Kiguchiya, S., Ishihara, N., Hayashi, J., Mihara, K., y Oka, T. (2008). Characterization of the mitochondrial protein LETM1, which maintains the mitochondrial tubular shapes and interacts with the AAA-ATPase BCS1L. *J Cell Sci* 121, 2588-2600.
- Taylor, R.W., McDonnell, M.T., Blakely, E.L., Chinnery, P.F., Taylor, G.A., Howell, N., Zeviani, M., Briem, E., Carrara, F., y Turnbull, D.M. (2003). Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution. *Ann Neurol* 54, 521-524.

- Taylor, R.W., y Turnbull, D.M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 6, 389-402.
- Terui, Y., Furukawa, Y., Kikuchi, J., y Saito, M. (1995). Apoptosis during HL-60 cell differentiation is closely related to a G0/G1 cell cycle arrest. *J Cell Physiol* 164, 74-84.
- Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.
- Tzagoloff, A. (1995). Ubiquinol-cytochrome-c oxidoreductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 260, 51-63.
- Ugalde, C., Vogel, R., Huijbens, R., Van Den Heuvel, B., Smeitink, J., y Nijtmans, L. (2004). Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies. *Hum Mol Genet* 13, 2461-2472.
- Vale, R.D. (2000) AAA proteins. Lords of the ring. *J Cell Biol* 150, F13-F19.
- van den Heuvel, L.P., Smeitink, J.A., y Rodenburg, R.J. (2004). Biochemical examination of fibroblasts in the diagnosis and research of oxidative phosphorylation (OXPHOS) defects. *Mitochondrion* 4, 395-401.
- Verkaart, S., Koopman, W.J., Cheek, J., van Emst-de Vries, S.E., van den Heuvel, L.W., Smeitink, J.A., y Willems, P.H. (2007). Mitochondrial and cytosolic thiol redox state are not detectably altered in isolated human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1772, 1041-1051.
- Visapää, I., Fellman, V., Vesa, J., Dasvarma, A., Hutton, J.L., Kumar, V., Payne, G.S., Makarow, M., Van Coster, R., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., Suomalainen, A., y Peltonen, L. (2002). GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in *BCS1L*. *Am J Hum Genet* 71, 863-876.
- Vives-Bauza, C., Gonzalo, R., Manfredi, G., Garcia-Arumi, E., y Andreu, A.L. (2006). Enhanced ROS production and antioxidant defenses in cybrids harbouring mutations in mtDNA. *Neurosci Lett* 391, 136-141.

- Wai, T., Teoli, D., y Shoubridge, E.A. (2008). The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat Genet* 40, 1484-1488.
- Wallace, D.C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39, 359-407.
- Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hodge, J.A., Schurr, T.G., Lezza, A.M., Elsas, L.J., 2nd, y Nikoskelainen, E.K. (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242, 1427-1430.
- Wibbrand, F., Ravn, K., Schwartz, M., Rosenberg, T., Horn, N., y Vissing, J. (2001). Multisystem disorder associated with a missense mutation in the mitochondrial *cytochrome b* gene. *Ann Neurol* 50, 540-543.
- Wu, M., y Tzagoloff, A. (1989). Identification and characterization of a new gene (*CBP3*) required for the expression of yeast coenzyme QH₂-cytochrome c reductase. *J Biol Chem* 264, 11122-11130.
- Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., y Deisenhofer, J. (1997). Crystal structure of the cytochrome *bc*₁ complex from bovine heart mitochondria. *Science* 277, 60-66.
- Yang, M., y Trumpower, B.L. (1994). Deletion of *QCR6*, the gene encoding subunit six of the mitochondrial cytochrome *bc*₁ complex, blocks maturation of cytochrome *c*₁, and causes temperature-sensitive petite growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269, 1270-1275.
- Yu, L., Tso, S.C., Shenoy, S.K., Quinn, B.N., y Xia, D. (1999). The role of the supernumerary subunit of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *bc*₁ complex. *J Bioenerg Biomembr* 31, 251-257.
- Zara, V., Conte, L., y Trumpower, B.L. (2007). Identification and characterization of cytochrome *bc*(1) subcomplexes in mitochondria from yeast with single and double deletions of genes encoding cytochrome *bc*(1) subunits. *Febs J* 274, 4526-4539.
- Zeviani, M., Servidei, S., Gellera, C., Bertini, E., DiMauro, S., y DiDonato, S. (1989). An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature* 339, 309-311.

Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V.M., Chi, Y.I., Kim, K.K., Hung, L.W., Crofts, A.R., Berry, E.A., y Kim, S.H. (1998). Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc1*. *Nature* 392, 677-684.

El trabajo presentado en esta Tesis ha dado lugar a la publicación de los siguientes artículos:

Blázquez, A., **Gil-Borlado, M.C.**, Morán, M., Verdú, A., Cazorla-Calleja, M.R., Martín, M.A., Arenas, J., y Ugalde, C. (2009). Infantile mitochondrial encephalomyopathy with unusual phenotype caused by a novel *BCSIL* mutation in an isolated complex III-deficient patient. *Neuromuscul Disord* 19, 143-146.

Gil-Borlado, M.C., González-Hoyuela, M., Blázquez, A., García-Silva, M.T., Gabaldón, T., Manzanares, J., Vara, J., Martín, M.A., Seneca, S., Arenas, J. y Ugalde, C. (2009). Pathogenic mutations in the 5' untranslated region of *BCSIL* mRNA in mitochondrial complex III deficiency. *Mitochondrion* (aceptado).

ABSTRACT

Mutations in the assembly chaperone *BCS1L* constitute a major cause of mitochondrial complex III deficiency. We studied the presence of *BCS1L* mutations in a complex III-deficient patient with metabolic acidosis, liver failure, and tubulopathy. A reported mutation, p.R56X, was identified in one allele of *BCS1L*, and two novel heterozygous mutations, g.1181A>G and g.1164C>G, were detected in the second allele. The g.1181A>G mutation generated an alternative splicing site in *BCS1L* mRNA, causing a 19-nucleotides deletion in its 5'UTR region. Decreased *BCS1L* mRNA and protein levels, and a respiratory chain complex III assembly impairment, establish a pathogenic role for the novel *BCS1L* mutations.

KEYWORDS: Mitochondria; respiratory chain complex III deficiency; BCS1L mutations; assembly impairment

1. INTRODUCTION

Mitochondrial respiratory chain complex III deficiency [MIM 124000] is a relatively common defect of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system, associated with a wide variety of visceral, muscular and neurological disorders (Borisov 2002). Mitochondrial complex III (CIII, ubiquinol-cytochrome c reductase or cytochrome bc₁ complex, E.C.1.10.2.2) is a multiprotein enzyme complex that catalyzes the transfer of electrons from reduced coenzyme Q to cytochrome c, with a concomitant translocation of protons across the inner mitochondrial membrane (Baum et al. 1967). The purified bovine complex is a symmetric homodimer with a combined molecular mass of ~450 kDa (Iwata et al. 1998;Xia et al. 1997). Each monomer is composed of 11 subunits, ten encoded in the nucleus and one (cytochrome b) in the mitochondrial genome. Because of the bi-genomic origin of the complex, mutations leading to a complex III defect can be ascribed to both mitochondrial and nuclear genes (Borisov 2002). Mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in the *cytochrome b* (*MT-CYB*) gene constitute a major cause of complex III deficiency (Andreu et al. 1999), but they only account for a small percentage of the total number of complex III-deficient patients. Mutations in nuclear structural genes are not common, and only the genes *UQCRCQ* and *UQCRCB*, which encode complex III subunits, have been associated to complex III deficiency (Barel et al. 2008;Haut et al. 2003). Most mutations have been reported in the gene encoding the complex III assembly factor BCS1L (figure 1), a mitochondrial inner membrane protein that acts as a chaperone for the insertion of the Rieske Fe/S subunit into complex III (Cruciat et al. 1999). These mutations underlie several phenotypes ranging from Björnstad syndrome (autosomal recessive disorder characterized by sensorineural hearing loss and pili torti) (Hinson et al. 2007) or GRACILE syndrome (fetal growth retardation, aminoaciduria, cholestasis, iron overload, lactic acidosis, and early death, MIM 603358) (Fellman 2002;Visapaa et al. 2002), to fatal complex III deficiency in neonates presenting with encephalopathy, alone or in combination with visceral involvement (de et al. 2001;De et al. 2003;Fernandez-Vizarra et al. 2007).

We report a complex III-deficient patient with early-onset metabolic acidosis, liver failure, and tubulopathy, who harbored two novel mutations in the 5'UTR region of *BCS1L* mRNA besides a p.R56X nonsense mutation in the *BCS1L* coding sequence. The effects of these mutations on the expression of *BCS1L* mRNA, BCS1L protein and mitochondrial complex III assembly have been analyzed.

2. PATIENT AND METHODS

Case Report

The proband's family is of Spanish origin. The patient was a boy born to non-consanguineous parents after a 35-week pregnancy and delivery by cesarean section. In the neonatal period he presented with cholestasis, liver failure and sepsis; later he developed tubulopathy and failure to thrive. Laboratory results showed elevated levels of hepatic enzymes and bilirubin, coagulation dysfunction, hypoglycaemia, and lactic acidosis (range 4.91-5.78 mM; normal <2.0 mM). At age 2.5 months he was admitted to our hospital because of dehydration, tachypnea, and jaundice. Weight (2,860g) and height (51cm) were below normal. Neurological examination was normal. Blood laboratory data revealed anaemia, lactic acidosis, hypoglycaemia, liver dysfunction, and serum electrolyte levels and urine tests suggestive of Toni-Debré-Fanconi syndrome. The patient underwent liver, quadriceps muscle and skin biopsies at age three months. Liver morphology revealed cholestasis, diffuse fibrosis, ductal proliferation and no hemosiderosis. Muscle histochemistry was normal. Following the liver biopsy the proband presented with peritonitis and sepsis, he was successfully treated and discharged at age 5 months. One month later, clinical examination revealed mild muscle hypotonia and microcephaly. Brain MRI was normal. At age 11 months, the clinical condition worsened because of liver failure and he died of sepsis, despite antibiotics and intensive care support.

Fibroblast Cultures

Fibroblasts were obtained from skin biopsies and cultured in DMEM medium (Life Technologies) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 100 IU/ml penicillin and 100 IU/ml streptomycin.

Enzyme activities of mitochondrial respiratory chain complexes

Mitochondrial respiratory chain enzyme activities were performed in muscle homogenates and cultured skin fibroblasts according to established methods (Martinez et al. 2001), and expressed relative to the citrate synthase activity in muscle, and relative to their specific activities in fibroblasts.

Genomic DNA sequence analysis

Total DNA was extracted from blood and fibroblasts by standard methods. The whole mitochondrial DNA (mtDNA) from patient's fibroblasts was sequenced by SECUGEN S.L (Madrid, Spain). Overlapping fragments of the entire *BCS1L* genomic region, which included all exons, introns, and the 5' and 3' UTR regions, were sequenced on an ABI

Prism System 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and compared with the deposited ENSEMBL (accession number ENSG00000074582) and GenBank (accession number AF516670) sequences for the *BCSIL* gene. The p.R56X mutation was confirmed by RFLP-PCR analysis in the proband's family, by using primers that spanned the region between the two first coding exons: 5'-TGTAAGGTTTGGTGTTCCTTT-3', (forward) and 5'-GGATGTTGAAGAAAACCTTTCG-3' (reverse), and digestion with the restriction enzyme *AvaI* (New England Biolabs). The g.1181A>G and g.1164C>G mutations were confirmed by RFLP-PCR analysis using primers 5'-GTTGGAGGAGAGGTGTACTA-3' (forward) and 5'-CCTAACACTACCTGTTTAGCA-3' (reverse) and digestion with restriction enzymes *DraIII* and *NlaIV* (New England Biolabs), respectively. Four hundred healthy alleles of Spanish background were screened for the novel mutations.

Characterization of the *BCSIL* mRNA variants

Total RNA from aged-matched control and patient's fibroblasts was extracted by TRIzol® (Invitrogen), DNase I treated and reverse-transcribed by using an oligo dT primer with the SuperScript™ first-strand synthesis system for RT-PCR kit (Invitrogen). The *BCSIL* cDNA was amplified and sequenced with specific oligonucleotides that matched the NM_004328 Genbank reference sequence, corresponding to the long *BCSIL* transcript variant. For the characterization of the *BCSIL* 5'UTR, *BCSIL* cDNA fragments were amplified with primers spanning the region between the first non-coding exon (5'-GGCGGATCTTATTGTCTACG-3', forward) and the first coding exon (5'-AGTAGGGATTGTCCTTCAGAG-3', reverse). Partial cDNA fragments were subcloned into the pGEMTeasy vector (Promega) prior to sequencing. Each fragment was sequenced in both strands. Control and mutant samples were never processed in parallel in order to avoid DNA contaminations. Sequences were BLAST-analyzed against the human expressed sequence tags database (dbEST), and a new partial sequence for control *BCSIL* mRNA was submitted to Genbank (accession number EF672347). The presence of the p.R56X mutation in the proband's *BCSIL* cDNA was confirmed by RFLP-PCR analysis with the same oligonucleotides used for the genomic DNA analysis.

Quantitative Real-Time PCR of the *BCSIL* transcript

The determination of the expression profile of the *BCSIL* transcript was performed by two-step reverse transcription PCR and online monitoring of PCR products based on the use of FastStart Universal SYBR Green Master (Roche Applied Science) with a HT

7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). The PCR reactions were performed in a total volume of 10 µl containing an aliquot of 1 µl of each cDNA, 0.5 µM of primers, and 5 µl of FastStart Universal SYBR Green Master. The BCS1L amplicon was generated by the use of forward primer (5'-TGGTATCGGGGGAAATGGATT-3') and reverse primer (5'-GGATGTTGAAGAAAACCTTTCG-3'). The PCR conditions were 15 sec at 95 °C, 1 min at 60 °C, and 30 sec at 72 °C for 40 cycles. For the amplification of β-actin we used forward primer 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3' and reverse primer 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'. Each sample was run in triplicate, and the results reported represent the mean of three different sets of experiments. The PCR program was followed by a melting curve program consisting of a continuous measuring step at 0.5 °C/s up to 95 °C.

Mitochondrial Protein Isolation and Blue Native Analysis

Blue native methods were previously described (Nijtmans, Henderson, & Holt 2002). Primary antibodies (Molecular Probes) were raised against complex I NDUFA9 subunit, complex III Rieske subunit, complex IV COX5A, complex II 70 kDa subunit, and BCS1L (Abnova). Peroxidase-conjugated anti-mouse IgGs or Peroxidase conjugated anti-rabbit IgGs were used as secondary antibody (Molecular Probes). The signal was detected with ECL[®] plus (Amersham Biosciences).

3. RESULTS

Mitochondrial respiratory chain enzyme activities showed an isolated complex III deficiency in the patient's muscle, and a combined defect of complexes III and IV in fibroblasts (table 1). Complex I activity was not measured in skeletal muscle because no further muscle sample was available after measuring other respiratory chain enzyme activities.

Whole mitochondrial DNA (mtDNA) sequence analysis ruled out the presence of genetic rearrangements or pathogenic mutations. Sequencing of the entire *BCS1L* genomic sequence in patient's fibroblasts and RFLP-PCR analyses revealed that the proband was a compound heterozygous carrier for a reported p.R56X nonsense mutation (De, Seneca, Damis, Sepulchre, Hoorens, Gerlo, Garcia Silva, Hernandez, Lissens, & Van 2003), and two novel mutations in the *BCS1L* genomic region, g.1181A>G and g.1164C>G (AF516670 GenBank reference sequence) (figure 2A). His father and sister were heterozygous for the p.R56X mutation (figure 2B), while his healthy mother was heterozygous for the g.1181A>G and g.1164C>G mutations, both located in the same allele (figure 2C). The new mutations were ruled out in 400 control alleles of Spanish origin.

The g.1181A>G and g.1164C>G mutations are positioned 840 and 857 nucleotides upstream of the ATG translation initiation codon, respectively. These -840 and -857 nucleotide positions lie within the second non-coding exon that corresponds to the 5'UTR region of the *BCS1L* long transcript variant (Genbank NM_004328) (figure 3A). For this reason, we decided to sequence the whole *BCS1L* cDNA in control and patient's fibroblasts. In controls, the genetic analysis of amplified *BCS1L* cDNA fragments revealed a new partial 5'UTR sequence for *BCS1L* mRNA (Genbank accession number EF672347) (figure 3A). This variant supports the existence of alternatively spliced UTRs on different species of *BCS1L* mRNAs, as previously proposed (Petrzzella et al. 1998; Visapaa, Fellman, Vesa, Dasvarma, Hutton, Kumar, Payne, Makarow, Van, Taylor, Turnbull, Suomalainen, & Peltonen 2002). In the patient, the heterozygous g.1181A>G mutation created a new alternative splicing site that generated a 19-nucleotides deletion 68 nucleotides upstream from the ATG translation initiator of *BCS1L* cDNA (figure 3B). This 19-nucleotides deletion was neither present in control sequences nor in the Genbank EST database.

The g.1181A>G and g.1164C>G mutations modify nucleotide residues that are highly conserved in primates (almost 100% sequence identity), although significant variations

in the sequence, including some deletions, can be observed in rodents and laurasatherians (figure 3C). Besides, the 19-nucleotides deleted region is highly conserved throughout evolution, suggesting an important functional role for this region. Using the mFOLD prediction program (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html>), the combined effect of both mutations on *BCS1L* mRNA structure is shown (figure 3D).

To check whether these mutations affected the steady-state *BCS1L* mRNA levels in our patient, the *BCS1L* transcript was quantified by real time PCR, which enabled the determination of the *BCS1L* transcript with respect to the β -actin transcript used as an internal reference. The PCR results showed that the relative amount of the *BCS1L* transcript in the fibroblasts of our patient was reduced to ~30% of the controls (figure 4A), suggesting a *BCS1L* mRNA stability defect. In order to determine the relative amount of the *BCS1L* transcript that harboured the p.R56X nonsense mutation, *Ava*I-RFLP-PCR analysis was performed in *BCS1L* cDNA extracted from primary fibroblasts of an aged-matched control and our patient. Quantitative analysis of three independent gels indicated that ~10-15% of the transcripts harboured the p.R56X nonsense mutation, while the remainder transcripts harboured the g.1181A>G and g.1164C>G mutations (figure 4B). This result indicates the presence in the patient of the two *BCS1L* mRNA species transcribed from both alleles. A possible contamination of genomic DNA in our cDNA samples was ruled out after performing separated RFLP-PCR analyses of the p.R56X mutation in the proband's *BCS1L* genomic DNA and cDNA with the same oligonucleotide pair (supplemental figure).

In order to check whether the decreased *BCS1L* mRNA levels could affect the expression of the BCS1L protein and thus, the incorporation of the catalytic Rieske Fe/S protein into complex III, we carried out blue-native gel electrophoresis (BN-PAGE) on dodecylmaltoside-treated mitochondria from control and patient's fibroblasts (figure 5). Western blot analysis using an antibody against the BCS1L protein showed a marked reduction in the amount of the ~400 kDa BCS1L complex in patient's fibroblasts. Accordingly, we found lower steady-state levels of the ~450 kDa complex III dimer in patient's fibroblasts when an antibody against the complex III Rieske Fe/S (RISP) subunit was used. Additionally, the RISP subunit accumulated in a ~300 kDa subcomplex that was absent in the control, suggesting a complex III assembly or stability defect. This subcomplex did not co-localize with the BCS1L complex, as previously shown (Fernandez-Vizarra, Tiranti, & Zeviani 2008). Western blot analysis

using antibodies against specific OXPHOS subunits revealed normal steady-state levels of respiratory chain complexes I, II and IV in the proband (figure 5). Similarly, mitochondrial complex I *in-gel* activity was normal, confirming the spectrophotometric enzyme analysis in fibroblasts (table 1).

DISCUSSION

We studied a Spanish patient with neonatal metabolic acidosis, failure to thrive, liver failure, tubulopathy and a complex III enzyme defect in muscle and fibroblasts, who later developed mild muscle hypotonia and microcephaly. Molecular analysis of the *BCS1L* gene in our patient revealed three heterozygous mutations: a reported p.R56X change in the father's allele, which presumably leads to a truncated BCS1L protein (De, Seneca, Damis, Sepulchre, Hoorens, Gerlo, Garcia Silva, Hernandez, Lissens, & Van 2003), and two novel g.1181A>G and g.1164C>G mutations in the mother's allele. These were the only genetic alterations in the whole *BCS1L* genomic region, and the mutations were absent in four hundred control alleles of Spanish origin.

The presence of two new genetic variants in the 5' upstream non-coding region of the *BCS1L* gene suggested a problem at the transcript level. Genetic analysis of *BCS1L* cDNA revealed the presence of both g.1181A>G and g.1164C>G mutations in the 5' untranslated region of *BCS1L* mRNA. Several lines of evidence supported the deleterious effects of at least the g.1181A>G mutation (we cannot preclude the possibility of some effect, if any, of the g.1164C>G mutation). First, no other genetic alterations were found in the *BCS1L* cDNA, besides the p.R56X mutation. Second, the g.1181A>G mutation created a new alternative splicing site only 68 nucleotides upstream from the ATG translation initiator. As a result, a 19-nucleotide deletion was generated in the 5'UTR region of *BCS1L* mRNA, which predicted dramatic changes in the mutant *BCS1L* mRNA structure. Third, this deletion was specific of the cDNA amplified from the allele containing the 5'UTR mutations, it was not present in the control cDNAs tested, and it was not reflected in at least 300 sequences from the Genbank expressed sequenced tags (EST) database. Fourth, quantitative analysis of the *BCS1L* transcript showed that the *BCS1L* mRNA levels were severely decreased in the patient. The two *BCS1L* mRNA species transcribed from both alleles were present in the patient: one containing the p.R56X mutation (albeit at reduced levels), and the most abundant one containing the g.1164C>G mutation together with the 19-nucleotide deletion. Our results suggest that the p.R56X mutation, leading to the introduction of a stop codon, can result in a transcript that is rapidly degraded with suppression of the synthesis of the truncated BCS1L protein. This might happen due to the elicitation of a mechanism of nonsense mediated decay (NMD) (Culbertson 1999), a quality control mechanism that ensures fidelity of gene expression. However, such a mechanism would only be partially induced in our patient and cannot account for the whole reduction of

the *BCS1L* mRNA levels, since still low levels of the transcript that harboured the p.R56X mutation were observed. Thus, our results strongly suggest that in addition, the novel mutations in the 5'UTR would also contribute to the degradation of the *BCS1L* transcript.

Consistent with these results, we found decreased expression levels of mitochondrial BCS1L protein and a complex III assembly impairment. Given the facts that: 1) the Rieske Fe-S protein is incorporated into complex III when the BCS1L assembly factor is functionally-active, but 2) we find markedly decreased levels of BCS1L complex, as previously described in patients with *BCS1L* mutations (Hinson et al, 2007; Fernandez-Vizarra et al., 2007), 3) the levels of the Rieske subunit in complex III are also lower in the patient, and this subunit accumulates in a low molecular weight subcomplex that indicates a complex III assembly or stability defect, 4) that the Rieske protein constitutes one of the three subunits necessary to catalyze the transfer of electrons in complex III, and 5) that we observe a clear reduction in complex III activity in our patient, we consider that our data plead in favour of a functional defect in BCS1L. In our patient, low levels of mitochondrial BCS1L would result in a defective integration of the Rieske protein into complex III and a consequent loss of complex III activity. The complex III deficiency was accompanied by a mild complex IV activity defect in fibroblasts in which complex IV assembly levels, however, were normal (table 1 and figure 5). A similar observation was described in two *BCS1L*-mutated patients (Fernandez-Vizarra et al., 2007), suggesting a regulatory role for BCS1L in complex IV activity.

It has been hypothesized that the impact of the *BCS1L* mutations might account for the clinical spectrum of the disease (Fernandez-Vizarra, Bugiani, Goffrini, Carrara, Farina, Procopio, Donati, Uziel, Ferrero, & Zeviani 2007; Fernandez-Vizarra, Tiranti, & Zeviani 2008; Hinson, Fantin, Schonberger, Breivik, Siem, McDonough, Sharma, Keogh, Godinho, Santos, Esparza, Nicolau, Selvaag, Cohen, Hoppel, Tranebjaerg, Eavey, Seidman, & Seidman 2007). For example, mutations associated with GRACILE are the most severe (50% die before 12 days and 50% before 4 months), complex III deficiency mutations are relatively less severe (most children live from 3 months to 5 years), and Bjornstad syndrome mutations are the least severe (normal life span). In this regard, complex III deficiency and GRACILE syndrome are only subtly different. Although our patient shared a similar clinical picture to other patients with *BCS1L* mutations (de, Valnot, Barrientos, Gorbatyuk, Tzagoloff, Taanman, Benayoun, Chretien, Kadhon,

Lombes, de Baulny, Niaudet, Munnich, Rustin, & Rotig 2001; De, Seneca, Damis, Sepulchre, Hoorens, Gerlo, Garcia Silva, Hernandez, Lissens, & Van 2003; Fernandez-Vizarra, Bugiani, Goffrini, Carrara, Farina, Procopio, Donati, Uziel, Ferrero, & Zeviani 2007), he showed unusual features for complex III deficiency. For example, his clinical description was not indicative of brain involvement, since muscle hypotonia has a broad differential that includes primary muscle and primary neuromuscular junction causes, and MRI was normal. Therefore, it could be argued that our patient showed clinical features of GRACILE syndrome, characterized by the following canonical findings: growth retardation, aminoaciduria, cholestasis, iron overload and early death. However, our patient showed all the cardinal features for GRACILE syndrome except iron overload, even in a liver biopsy taken at age three months, a time of evolution in which iron overload should have become apparent. If the canonical criteria that define a particular mitochondrial syndrome must be fulfilled for any patient to be considered as having such a syndrome, we cannot properly state that our patient presented with GRACILE, but with a “GRACILE-like” syndrome.

Interestingly, a previous mutation was described in the *BCS1L* non-coding region at a position 588 nucleotides upstream from the ATG translation initiator (figure 1, g.1433T>A), in a British infant with CIII deficiency (Visapaa, Fellman, Vesa, Dasvarma, Hutton, Kumar, Payne, Makarow, Van, Taylor, Turnbull, Suomalainen, & Peltonen 2002). Position -588 would lie within the first or second intronic regions of *BCS1L*, depending on the analyzed mRNA variant. However, it might form part of a functional region of a yet-undetermined alternative *BCS1L* transcript that could explain its putative deleterious effect. Although *BCS1L* seems to be ubiquitously expressed, observations during mice embryonal development support tissue-specific differences in its expression that might account for the organ specific manifestations of disease (Kotarsky et al. 2007). We might speculate that, in our patient, the presence of neurological involvement (i.e. mild muscle hypotonia) in later stages of his clinical course might be related to age-dependent differences in tissue-specific expression of *BCS1L* mutant transcripts. Precise characterization of the alternative *BCS1L* mRNA splice variants and their tissue-specific expression will be of outmost importance to understand the clinical and biochemical heterogeneity of *BCS1L* mutations.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge Celia Pérez-Cerdá for her invaluable help, and Pilar del Hoyo and Juan Carlos Rubio for their excellent technical support. This study was partially supported by ISCIII (Ministry of Health) to C.U. (grant numbers 04/00011 and PI05-0379), and by Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña to M.A.M. (2005-069). T.G. was supported by EMBO (LTF-402-2005) and ISCIII (06/00213) grants. At the time of this work, M.G.H. was recipient of a Juan de la Cierva research contract (number 2005-105) from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC).

REFERENCES

- Andreu, A.L., Hanna, M.G., Reichmann, H., Bruno, C., Penn, A.S., Tanji, K., Pallotti, F., Iwata, S., Bonilla, E., Lach, B., Morgan-Hughes, J., DiMauro, S. 1999. Exercise intolerance due to mutations in the *cytochrome b* gene of mitochondrial DNA. *N.Engl.J.Med.* 341, 1037-1044.
- Barel, O., Shorer, Z., Flusser, H., Ofir, R., Narkis, G., Finer, G., Shalev, H., Nasasra, A., Saada, A., Birk, O.S. 2008. Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in *UQCRCQ*. *Am.J.Hum.Genet.* 82, 1211-1216.
- Baum, H., Rieske, J.S., Silman, H.I., Lipton, S.H. 1967. On the mechanism of electron transfer in complex III of the electron transfer chain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 57, 798-805.
- Borisov, V.B. 2002. Defects in mitochondrial respiratory complexes III and IV, and human pathologies. *Mol.Aspects Med.* 23, 385-412.
- Cruciat, C.M., Hell, K., Folsch, H., Neupert, W., Stuart, R.A. 1999. Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome bc(1) complex. *EMBO J.* 18, 5226-5233.
- Culbertson, M. R. 1999, "RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer", *Trends Genet.*, vol. 15, no. 2, pp. 74-80.
- De Lonlay, P., Valnot, I., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Tzagoloff, A., Taanman, J.W., Benayoun, E., Chretien, D., Kadhon, N., Lombes, A., de Baulny, H.O., Niaudet, P., Munnich, A., Rustin, P., Rotig, A. 2001. A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat.Genet.* 29, 57-60.
- De Meirleir L., Seneca, S., Damis, E., Sepulchre, B., Hoorens, A., Gerlo, E., Garcia Silva, M.T., Hernandez, E.M., Lissens, W., Van Coster R. 2003. Clinical and diagnostic characteristics of complex III deficiency due to mutations in the *BCS1L* gene. *Am.J.Med.Genet.* 121, 126-131.
- Fellman, V. 2002. The GRACILE syndrome, a neonatal lethal metabolic disorder with iron overload. *Blood Cells Mol.Dis.* 29, 444-450.

Fernandez-Vizarra, E., Bugiani, M., Goffrini, P., Carrara, F., Farina, L., Procopio, E., Donati, A., Uziel, G., Ferrero, I., Zeviani, M. 2007. Impaired complex III assembly associated with *BCS1L* gene mutations in isolated mitochondrial encephalopathy. *Hum.Mol.Genet.* 16, 1241-1252.

Fernandez-Vizarra, E., Tiranti, V., & Zeviani, M. 2009, "Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: What we have learned by studying its defects", *Biochim.Biophys.Acta.* 1793, 200-211.

Haut, S., Brivet, M., Touati, G., Rustin, P., Lebon, S., Garcia-Cazorla, A., Saudubray, J. M., Boutron, A., Legrand, A., Slama, A. 2003. A deletion in the human *QP-C* gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis. *Hum.Genet.* 113, 118-122.

Hinson, J.T., Fantin, V.R., Schonberger, J., Breivik, N., Siem, G., McDonough, B., Sharma, P., Keogh, I., Godinho, R., Santos, F., Esparza, A., Nicolau, Y., Selvaag, E., Cohen, B.H., Hoppel, C.L., Tranebjaerg, L., Eavey, R.D., Seidman, J.G., Seidman, C.E. 2007. Missense mutations in the *BCS1L* gene as a cause of the Bjornstad syndrome. *N.Engl.J.Med.* 356, 809-819.

Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S., Jap, B.K. 1998. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science* 281, 64-71.

Kotarsky, H., Tabasum, I., Mannisto, S., Heikinheimo, M., Hansson, S., Fellman, V. 2007. *BCS1L* is expressed in critical regions for neural development during ontogenesis in mice. *Gene Expr.Patterns.* 7, 266-273.

Martinez, B., del Hoyo, P., Martin, M.A., Arenas, J., Perez-Castillo, A., Santos, A. 2001. Thyroid hormone regulates oxidative phosphorylation in the cerebral cortex and striatum of neonatal rats. *J.Neurochem.* 78, 1054-1063.

Nijtmans, L.G., Henderson, N.S., Holt, I.J. 2002. Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods* 26, 327-334.

Petruzzella, V., Tiranti, V., Fernandez, P., Ianna, P., Carrozzo, R., Zeviani, M. 1998. Identification and characterization of human cDNAs specific to *BCS1*, *PET112*, *SCO1*,

COX15, and *COX11*, five genes involved in the formation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Genomics* 54, 494-504.

Visapaa, I., Fellman, V., Vesa, J., Dasvarma, A., Hutton, J.L., Kumar, V., Payne, G.S., Makarow, M., Van Coster, R., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., Suomalainen, A., Peltonen, L. 2002. GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in *BCS1L*. *Am.J.Hum.Genet.* 71, 863-876.

Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., Deisenhofer, J. 1997. Crystal structure of the cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria. *Science* 277, 60-66.

LEGENDS FOR ILLUSTRATIONS

Figure 1. Known mutations in the *BCS1L* gene. Mutations that cause Björnstad syndrome are shown in light grey. The p.S78G mutation that causes GRACILE syndrome is indicated in grey and italics, and mutations causing complex III deficiency are shown in black. Asterisks show mutations associated with Björnstad syndrome and complex III deficiency. The two novel mutations in the 5'UTR region of the *BCS1L* mRNA are underlined. The ATG +1 translation initiation site is indicated with an arrow. Nucleotide 1 corresponds to nucleotide 2021 in the *BCS1L* genomic sequence (GenBank accession number AF516670).

Figure 2. (A) *BCS1L* family pedigree. Three heterozygous mutations were found in the *BCS1L* gene. The healthy father and elder sister were carriers of the reported p.R56X mutation. Two novel mutations, g.1181A>G and g.1164C>G, were identified in the unaffected mother. The patient was carrier of the three heterozygous mutations, c.166C>T (p.R56X), g.1181A>G and g.1164C>G. **(B)** Electropherograms showing the presence of the c.166C>T mutation in the proband's family. Asterisks represent the nucleotide substitution. **(C)** PCR-RFLP analysis of the g.1181A>G and g.1164C>G mutations. Uncut (wild-type) DNA corresponds to a 240 bp PCR product. The mutation g.1164C>G creates a *NlaIV* restriction site, resulting in two fragments of 142 and 88 bp. The mutation g.1181A>G creates a *DraIII* restriction site, resulting in two fragments of 159 and 81 bp. A standard 100-bp DNA reference ladder is shown in the middle of the gel.

Figure 3. (A) Schematic representation of the *BCS1L* mRNA variants described in this work. White boxes correspond to the exonic regions that form part of the mentioned mRNA sequences, lines indicate intronic regions. The novel mutations found in the 5'UTR region of the *BCS1L* mRNA are indicated in the patient. The g.1181A>G mutation creates a new alternative splicing site that generates a deletion of 19 nucleotides. The g.1164C>G mutation is located 17 nucleotides upstream in the 5'UTR. **(B)** Electropherogram showing the *BCS1L* cDNA sequence from patient's fibroblasts. The g.1181A>G and g.1164C>G mutations are circled. The sequence corresponding to the 19-nucleotide deletion generated by the g.1181A>G mutation is shown on top of the electropherogram. The boundary between exons 2 and 3 is indicated with an arrow. The ATG translation initiator is boxed. **(C)** Alignment of the mutated *BCS1L* cDNA region. The sequence spans nucleotides -868 to -821 of the 5' upstream region of the human *BCS1L* gene, and the corresponding homologous regions in other species. Sites -857

and -840, mutated in the patient, are indicated by arrowheads. The 19-nucleotide deletion is shown in grey. Conserved nucleotides are indicated by asterisks. **(D)** Prediction model of the structural changes caused by the novel mutations in the 5'UTR region of *BCS1L* mRNA. The Genbank EF672347 sequence was taken as a control probe for the mFOLD program. Position -857 would form part of an 11 nucleotides-long stem-loop that would disappear in the presence of the mutation. The 19 nucleotides-long region that is spliced out due to the g.1181A>G mutation would be part of a second stem-loop. The deletion of this stretch in the patient would affect the major part of one strand of this stem-loop, leaving the other strand free to pair with a different region of the mRNA. This re-organization of the transcript would cause important structural changes in one half of the 5'UTR.

Figure 4. (A) Real-time PCR analysis in total RNA from control and patient's fibroblasts. The determination of the *BCS1L* transcript with respect to the β -actin transcript, used as internal reference, is presented. The relative quantification is expressed by $2^{-(\Delta C_{t\text{patient}} - \Delta C_{t\text{con}})}$, where $\Delta C_t = C_{tBCS1L} - C_{t\beta\text{-actin}}$ for patient and control samples. The cycle number, C_t , represents the cycle at which the fluorescence signal crosses a certain threshold that is in correlation with the background fluorescence of the assay. The patient values are expressed as a percentage of the control values. **(B)** PCR-RFLP analysis of the heterozygous p.R56X mutation in *BCS1L* cDNA from mutant and control fibroblasts. Uncut DNA corresponds to a 478 bp PCR product. The p.R56X mutation eliminates an *AvaI* restriction site. The fragment amplified from the wild-type allele results after digestion in two fragments of 287 and 191 bp. A standard 100-bp DNA reference ladder is shown in the middle of the gel.

Figure 5. BN-PAGE analysis of mitochondrial respiratory chain complexes in fibroblasts from the *BCS1L* patient. Mitochondrial particles were isolated and 30 μ g protein were analyzed on a 4-15% BN-polyacrylamide gel for the separation of multisubunit complexes. Duplicate gels were run for complex I *in-gel* activity (IGA) assay (upper panel) and western blot analysis, which was performed using antibodies against the following OXPHOS subunits: complex I (CI) NDUFA9, complex III (CIII) Rieske Iron-Sulfur protein (RISP), complex IV (CIV) subunit COXVA, and complex II (CII) 70 kDa subunit. The signal obtained with a monoclonal BCS1L antibody is indicated in the lowest panel.

Supplemental figure. (A) PCR-RFLP analysis of the heterozygous p.R56X mutation in *BCS1L* total DNA extracted from blood from the proband's family members. Uncut DNA (wild-type) corresponds to a 576 bp PCR product. The p.R56X mutation eliminates an *AvaI* restriction site. The fragment amplified from the wild-type allele results after digestion in two fragments of 385 and 191 bp. (B) PCR-RFLP analysis of the p.R56X mutation in *BCS1L* cDNA from mutant and control fibroblasts. Uncut DNA corresponds to a 478 bp PCR product. The p.R56X mutation eliminates an *AvaI* restriction site. The fragment amplified from the wild-type allele results after digestion in two fragments of 287 and 191 bp. A standard 100-bp DNA reference ladder is shown in the middle of the gel. The same oligonucleotide pair was used for both reactions.

Table 1. Residual activities of the mitochondrial respiratory chain enzymes in different tissues from the index patient

Respiratory chain <i>Enzymatic activities</i>	Muscle*		Fibroblasts**	
	<i>Patient</i>	<i>Control range</i> (<i>n=100</i>)	<i>Patient</i>	<i>Control range</i> (<i>n=9</i>)
Complex I	nd	10-30	29.4	26-50
Complex II	6.9	4.5-17.4	9.9	10-17
Complex I+III	16.7	8.5-26.3	274	223-750
Complex II+III	7.8	4.5-21	3.7	4.4-18.7
Complex III	19.1	28-98	18.5	29-87
Complex IV (COX)	26.2	16-80	44.1	49-128
Citrate synthase (CS)	162	78-250	65	60-160

Enzyme activities are expressed in *mU/cU citrate synthase (CS) and **nmol.min⁻¹.mg prot⁻¹. CS activity is expressed as mU/mg protein. Abnormal values are indicated in bold characters. nd, not determined.

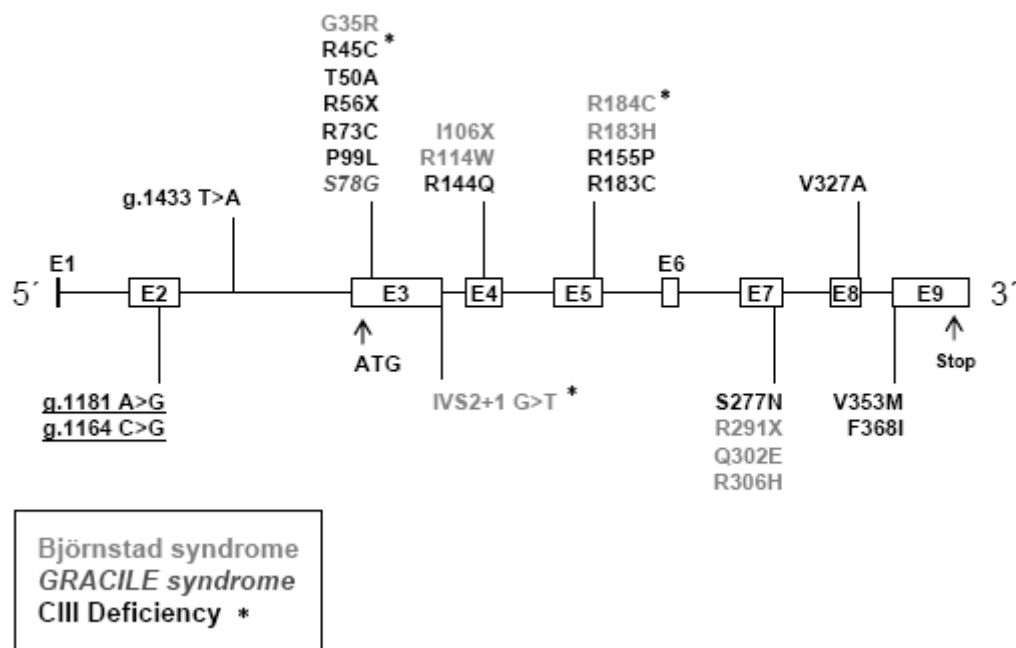


Figure 1.

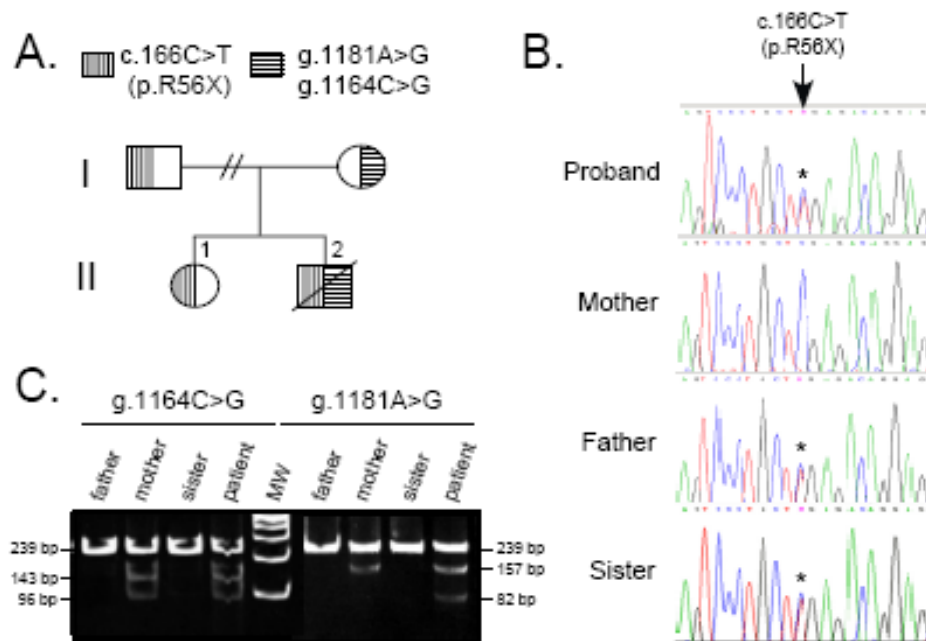


Figure 2.

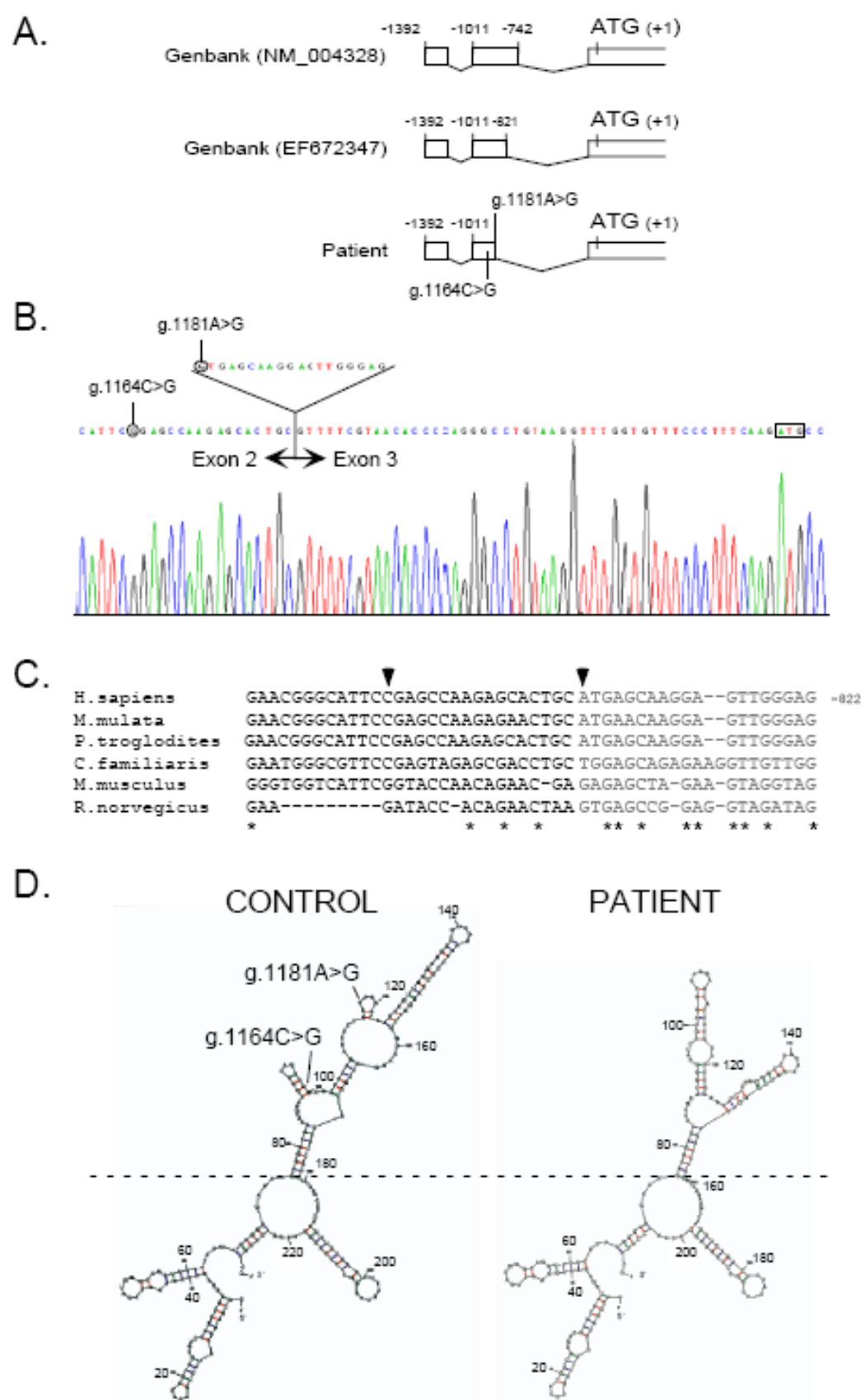


Figure 3.

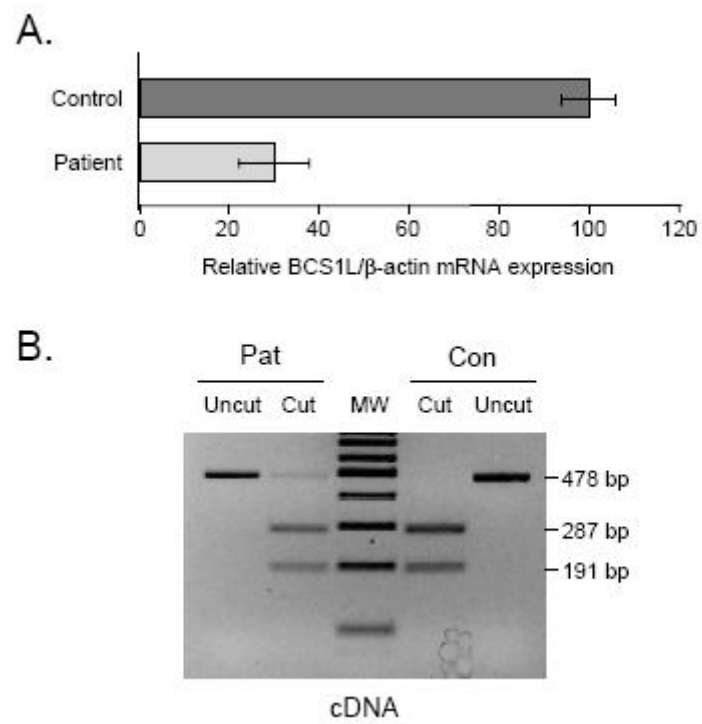


Figure 4.

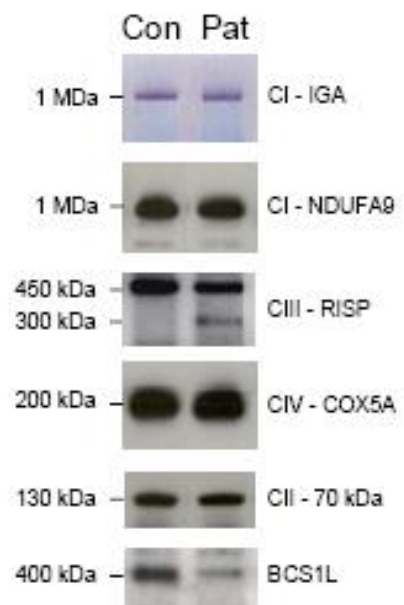
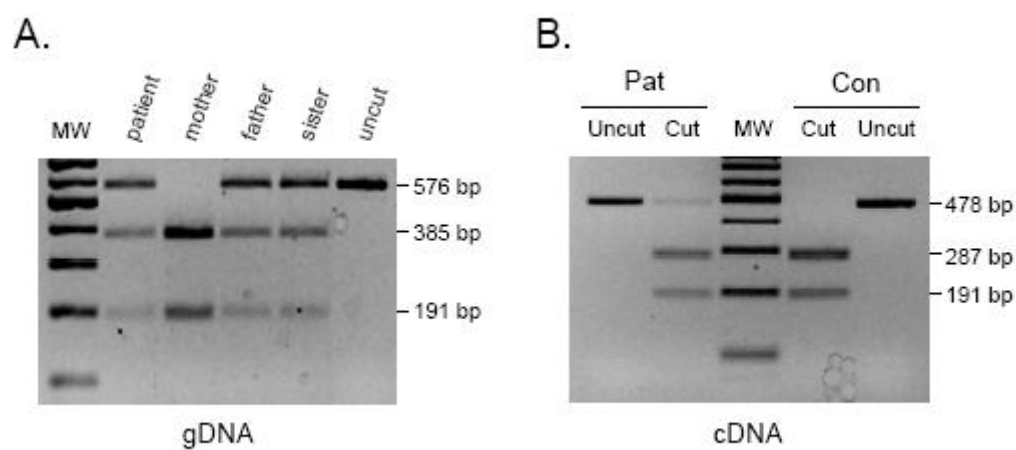


Figure 5.



Supplemental figure.